

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina Interna



TESIS DOCTORAL

**Estudio prospectivo de la reconstitución inmunológica en pacientes
sometidos a trasplante haploidéntico no manipulado con
ciclofosfamida postrasplante**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana María Pérez del Corral

Directores

Jesús Millán Núñez Cortés

José Luis Díez Martín

Javier Anguita Velasco

Madrid, 2017

Estudio prospectivo de la reconstitución inmunológica en pacientes sometidos a trasplante haploidéntico no manipulado con ciclofosfamida postrasplante.

Ana María Pérez Corral



PROYECTO DE TESIS DOCTORAL

Tesis doctoral presentada para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid.

Doctorando: Ana María Pérez Corral

Email:apcorral@salud.madrid.org

Directores:

Dr. Jesús Millán Núñez Cortés

Dr. José Luis Díez Martín

Dr. Javier Anguita Velasco

Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Departamento de Medicina Interna.

TÍTULO.

Estudio prospectivo de la reconstitución inmunológica en pacientes sometidos a trasplante haploidéntico no manipulado con ciclofosfamida postrasplante.

.



AGRADECIMIENTOS

A mis directores Dr. Millán, por su desinteresada colaboración, Dr. Díez Martín por su constante impulso de mejora, y muy especialmente al Dr. Anguita Velasco, por tantos años de aprendizaje constructivo.

A mis profesores que desde los primeros años de Facultad hasta los últimos de mi residencia como especialista han conseguido convertirme en el médico y la persona que soy. Aunque no es posible mencionarlos a todos sin olvidar a alguien no puedo dejar de nombrar al Dr. Alfonso Gómez Pineda, por su especial apoyo, por sus enseñanzas que cobran peso con el paso de los años y por haberme criticado siempre, y a la Dra. Mayayo Crespo, por su amistad y su especial punto de vista sobre la vida y la medicina del que tanto he aprendido.

A mis compañeros del Servicio de Hematología, especialmente del área de trasplante, que han hecho posible esta tesis al cuidar de los pacientes cada día, y a las Dras. Pascual y Ballesteros con las que he compartido esta aventura.

A José María Bellón y Pascual Balsalobre por su asesoramiento estadístico.

Al personal técnico del laboratorio de citometría y trasplante sin el que habría sido imposible crear este conocimiento.

A los médicos internos residentes en Hematología con los que he compartido todos estos años, especialmente a aquellos que han colaborado en este proyecto, Isabel González, Ana Carolina Franco y Diana Champ.

A la Fundación Mutua Madrileña por la financiación de este proyecto de investigación.

A mis padres por la genética y el apoyo incondicional. A mi padre por ser un ejemplo y mi madre por sufrir esta profesión con paciencia.

A mi marido por impulsarme siempre hacia delante en lo profesional y lo personal y por compartir conmigo la necesidad constante de mejorar.

INDICE

1. Abreviaturas.....	8
2. Resumen.....	10
3. Introducción	19
3.1. Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.....	19
3.1.1. Fundamentos e indicaciones. Fuentes de progenitores. Acondicionamiento.	19
3.1.2. Enfermedad Injerto contra Receptor.....	21
3.1.3. Búsqueda de donante. Papel del HLA en el trasplante hemopoyético.	23
3.1.4. Trasplante haploidéntico. Evolución histórica.	27
3.2. Inmunidad y trasplante.....	32
3.2.1. Sistema Inmune. Subpoblaciones linfocitarias relevantes.....	33
3.2.2. Reconstitución inmune en trasplante alogénico convencional.	35
3.2.2.1. Factores con influencia en la reconstitución inmune postrasplante. ...	35
3.2.2.2. Reconstitución de la inmunidad innata.....	36
3.2.2.3. Reconstitución de la inmunidad adaptativa.....	37
3.2.2.4. Complicaciones infecciosas en el trasplante de progenitores hemopoyéticos.....	42
3.2.3. Reconstitución inmune en trasplante haploidéntico no manipulado. Datos publicados.....	44
3.2.4. Papel de las células NK en el trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos.	48
3.2.5. Las células NK en el trasplante haploidéntico.....	53

3.3. Comentario final	54
4. Hipótesis y Objetivos	56
4.1. Hipótesis	56
4.2. Objetivos	56
5. Pacientes, Material y Métodos	60
5.1. Diseño del estudio	60
5.2. Selección de pacientes.....	60
5.3. Protocolos de trasplante y profilaxis de Enfermedad Injerto contra Receptor en grupo de estudio y grupo control.....	62
5.4. Variables clínicas	66
5.4.1. Variables registradas en el momento de inclusión	66
5.4.2. Variables de seguimiento.....	66
5.5. Procesamiento y análisis de las muestras. Variables analíticas.....	67
5.5.1. Estudios de citometría de flujo.....	67
5.5.2. Estudios séricos	71
5.6. Análisis estadístico.....	71
5.7. Aspectos éticos.....	72
5.7.1. Consentimiento informado.	73
5.7.2. Confidencialidad de los datos	73
5.7.3. Financiación.	74
5.7.4. Política de publicación.	74
6. Resultados	76

6.1. Características clínicas. Grupo de trasplante haploidéntico y grupo control.....	76
6.2. Comparación de la reconstitución inmune en ambos grupos.....	79
6.2.1. Poblaciones linfoides T.....	79
6.2.1.1. <i>Linfocitos T Naïve y de Memoria.....</i>	<i>81</i>
6.2.1.2. <i>Linfocitos de origen tímico.....</i>	<i>84</i>
6.2.1.3. <i>Linfocitos CD8+ con expresión de marcadores de citotoxicidad CD57+.</i>	<i>85</i>
6.2.1.4. <i>Linfocitos T activados con expresión de HLADR+ y CD38+</i>	<i>88</i>
6.2.1.5. <i>Linfocitos T reguladores</i>	<i>89</i>
6.2.3. Población Natural Killer.....	93
6.3. Análisis de la relación entre reconstitución inmune y Enfermedad Injerto contra Receptor.....	97
6.4. Análisis de la relación entre reconstitución inmune y reactivación de Citomegalovirus.....	103
6.5. Análisis de la relación entre reconstitución inmune y supervivencia. .	104
6.5.1. Supervivencia global	104
6.5.2. Supervivencia libre de enfermedad.....	106
6.5.3. Mortalidad de causa infecciosa.....	106
6.5.4. Células NK y supervivencia.....	108
6.5.5. Recaída.....	109
7. Discusión.....	111
7.1. Recuperación linfoide T.....	111
7.2. Recuperación linfoide B.....	116

7.3. Reconstitución NK	118
7.4. Reconstitución inmune y Enfermedad injerto contra Receptor en el trasplante haploidéntico.....	120
7.5. Reconstitución inmune y Citomegalovirus en el trasplante haploidéntico.	123
7.6. Reconstitución inmune y supervivencia en el trasplante haploidéntico.	124
7.7. Observaciones finales y limitaciones del estudio.	126
8. Conclusiones	130
9. Bibliografía	133
10. Anexos	144

1. Abreviaturas

ALC: Absolute lymphocyte count (Recuento absoluto de linfocitos)

Alo-TPH: Trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos

ATG: Gammaglobulina antitimocítica

CEIC: Comité Ético para la Investigación Clínica

CD: Células dendríticas

CIBMTR: Center for International Blood and Marrow Transplant Research (Centro internacional de investigación sobre el trasplante hemopoyético)

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad

CMV: Citomegalovirus

DNE: Donante no emparentado

EBMT: European Group for Blood and Marrow Donor Transplantation (Grupo europeo de trasplante hemopoyético)

EICR: Enfermedad injerto contra receptor

HLA: Human leucocyte antigen (antígeno leucocitario humano)

ICT: irradiación corporal total

ILD: Infusión de linfocitos del donante

LMA: Leucemia Mieloide Aguda

LLA: Leucemia Linfoide Aguda

LNH: Linfoma no Hodgkin

LH: Linfoma de Hodgkin

NIH: National Institutes of Health

NK: Natural Killer

SCU: Sangre de Cordón umbilical

SG: Supervivencia Global

SLE: Supervivencia libre de Enfermedad

RC: Respuesta completa

RP: Respuesta parcial

TCR: Receptor de células T

TGFbeta: Transforming growth factor beta (Factor de crecimiento transformador beta)

TNF: Tumoral necrosis factor (Factor de necrosis tumoral)

TPH: Trasplante de progenitores hemopoyéticos

TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand (Ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral)

TRECS: TCR Rearrangement Escisión Circles

Treg: Linfocitos T reguladores.

2. Resumen

Título:

Estudio prospectivo de la reconstitución inmunológica en pacientes sometidos a trasplante haploidéntico no manipulado con ciclofosfamida postrasplante.

Introducción:

El trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos (Alo-TPH) es el único tratamiento curativo para una amplia variedad de patología hematológica. Tradicionalmente para el Alo-TPH se requería la existencia de un donante familiar idéntico, situación que solo se da en un tercio de los pacientes. Para los dos tercios restantes la posibilidad de encontrar un donante no emparentado (DNE) HLA idéntico es de 60-80% en raza caucásica y 20% en otras minorías étnicas, y requiere un plazo de tiempo en ocasiones mayor a la urgencia de la indicación de trasplante. Adicionalmente, entre las fuentes alternativas de trasplante, la sangre de cordón umbilical (SCU) tiene limitaciones derivadas de la dosis de células progenitoras necesaria para asegurar el prendimiento en un adulto, lo que restringe sus posibilidades de uso. Por estas razones, el trasplante de donante haploidéntico (que solo comparte un haplotipo HLA con el receptor), se perfila como una opción atractiva ya que virtualmente el 100% de los pacientes con indicación de trasplante tendrían un donante haploidéntico familiar accesible en un plazo de tiempo muy corto. En los primeros años, para hacer posible un trasplante haploidéntico con unas aceptables tasas de Enfermedad Injerto contra Receptor (EICR) y de rechazo se utilizaron estrategias de eliminación de los linfocitos T del injerto que daban lugar a una reconstitución inmune lenta y limitada con un altísimo riesgo infeccioso que influía negativamente en el resultado final del trasplante. En los últimos años las nuevas estrategias de profilaxis de EICR han permitido realizar trasplantes haploidénticos no manipulados, sin eliminación

T, con excelentes resultados clínicos en cuanto a bajas tasas de EICR y complicaciones infecciosas, en probable relación a una mejor reconstitución inmune.

Objetivos y Diseño:

El presente estudio tiene como objetivo profundizar en el conocimiento de la reconstitución inmune después de un trasplante haploidéntico no manipulado con estrategia de profilaxis de la EICR basado en la utilización de ciclofosfamida postrasplante.

Para ello se diseñó un estudio prospectivo observacional con 2 ramas comparativas, un grupo de estudio de trasplante haploidéntico y un grupo control de trasplante familiar HLA idéntico convencional. La reconstitución inmune se midió en diferentes puntos (+15, +30, +60, +90, +180 y +360 días) durante el primer año postrasplante mediante la cuantificación y caracterización fenotípica de las diferentes subpoblaciones linfoides por citometría de flujo multiparamétrica y la cuantificación sérica de inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM.

Dentro del grupo de estudio haploidéntico, también se exploraron las relaciones entre la reconstitución inmune y la EICR aguda, la reactivación CMV y la supervivencia.

Resultados y conclusiones:

Se reclutaron de forma prospectiva 30 pacientes con trasplante haploidéntico no manipulado y 8 controles con trasplante de donante familiar HLA idéntico. Ambos grupos no mostraron diferencias estadísticamente significativas en sus características clínicas basales, excepto en las estrategias de prevención y tasas de EICR y en los días de prebendimiento hemopoyético, diferencias que son habituales en estos tipos de trasplante. La reconstitución inmune observada en el grupo de trasplante haploidéntico fue peor que en el grupo control en todas las subpoblaciones linfocitarias T y B estudiadas en el primer mes postrasplante.

La primera subpoblación linfocitaria que se recuperó en el grupo de estudio haploidéntico fueron las células NK, cuyos recuentos se normalizaron entre 1 y 3 meses postrasplante, aunque su maduración estaba retrasada frente al grupo control. Los linfocitos T CD8+ se recuperaron muy rápidamente a partir del día +90 y se normalizaron a los 6 meses postrasplante. Sin embargo, los linfocitos T CD4+ mostraron una reconstitución más lenta y solo se normalizaron al final del primer año. En el grupo haploidéntico se observó una reconstitución de origen tímico preservada, que se inició a partir del día +180, aunque también fue peor que la del grupo control, especialmente en lo que respecta a los linfocitos T CD4+. Destaca, sin embargo, una muy buena recuperación precoz de los linfocitos T reguladores (Treg) en el grupo de trasplante haploidéntico.

La reconstitución B respecto a la cuantificación de los linfocitos fue adecuada en el grupo haploidéntico, sin diferencias significativas frente al grupo control a partir del primer mes. La secuencia y periodos de recuperación de los niveles de inmunoglobulinas séricas siguieron en el grupo haploidéntico el patrón habitual descrito en los trasplantes convencionales, con aparición primero de la IgM, posteriormente e la IgG y por último de la IgA.

Los pacientes que habían desarrollado EICR tras el trasplante haploidéntico mostraron peor reconstitución de origen tímico, peor recuperación precoz de linfocitos T reguladores y una maduración NK más retrasada.

No se objetivaron diferencias significativas en cuanto a las subpoblaciones linfocitarias estudiadas entre los pacientes con y sin reactivación de CMV dentro del grupo de trasplante haploidéntico, excepto por una mayor respuesta de los linfocitos T citotóxicos esperada en aquellos pacientes afectados.

Adicionalmente, en los estudios de supervivencia, se objetivó una tendencia no estadísticamente significativa a una mayor supervivencia global en aquellos pacientes con mejor recuperación precoz de recuentos linfocitarios (Linfocitos totales y linfocitos T

por microlitro en el día +30 y linfocitos T CD4+ por microlitro en el día +90). También mostraron mejor supervivencia global aquellos pacientes con mayores porcentajes de células NK inmaduras en el primer mes.

En conclusión, la reconstitución inmune tras un trasplante haploidéntico no manipulado con ciclofosfamida postrasplante muestra algunas diferencias frente a la del trasplante de donante familiar HLA idéntico. La recuperación linfocítica T y B precoz es inferior en el trasplante haploidéntico frente al trasplante familiar HLA idéntico. Esto es especialmente significativo en lo que respecta a los linfocitos T CD4+, con la excepción de los linfocitos CD4+ T reguladores, que parecen ser respetados por esta modalidad de profilaxis de la EICR. La reconstitución NK, subpoblación linfocitaria a la que se atribuye importancia clínica en el control de la enfermedad neoplásica en este tipo de trasplante, es buena, aunque su maduración está retrasada. Cabe destacar también que la funcionalidad del timo, necesaria para la reconstitución a medio y largo plazo, está preservada en el trasplante haploidéntico. Por tanto, aunque la reconstitución inmune precoz en el trasplante haploidéntico es inferior a la observada en el grupo control, la buena recuperación de algunas subpoblaciones como las células NK y los linfocitos T reguladores, así como la preservación de la actividad tímica, hacen razonable especular sobre su influencia en los resultados favorables de este tipo de trasplante en lo que se refiere a complicaciones como la EICR, infecciosas, etc, y supervivencia. Las diferencias que el estudio evidencia con los trasplantes convencionales señalan posibles dianas de intervención terapéutica basada en terapia celular para mejorar diversos aspectos de la reconstitución inmune postrasplante haploidéntico, como infusiones de células NK, etc. Las peculiaridades observadas en la reconstitución linfocitaria de los pacientes que desarrollan EICR pueden ser de utilidad clínica para predecir y tratar esta complicación en el contexto de este tipo de trasplante.

A pesar de las limitaciones derivadas del tamaño muestral, que impiden alcanzar diferencias estadísticamente significativas, nuestro estudio reproduce las observaciones

previas de otros grupos sobre la importante relación entre la reconstitución inmune precoz y la supervivencia en el contexto del trasplante haploidéntico.

Todas estas observaciones apoyan la realización en el futuro de estudios adicionales de caracterización fenotípica y funcional de las subpoblaciones linfocitarias y su interrelación con los acontecimientos clínicos en el trasplante haploidéntico no manipulado con ciclofosfamida postrasplante.

Title: Study of postransplant immune reconstitution after a non manipulated haploidentical transplantation with postransplant cyclophosphamide as graft versus host disease prophylaxis.

Introduction:

Allogeneic transplantation (Allo-t) is the only curative treatment for a lot of the hematologic malignancies. The best donor for Allo-t is an HLA identical sibling, which is only found in one third of the patients with indication. For the remaining two thirds, the probability of having an HLA identical non familiar donor in international registries is 60-80% for Caucasians and 20% in ethnic minorities, and usually a long period of time is needed to manage it, regardless of the emergency of the indication. Between the alternative sources for transplantation, umbilical cord blood has other limitations as cell dose necessary for ensuring engraftment in adult patients. For all these reasons, haploidentical transplantation (which only shares one HLA haplotype with receptor), emerges as an attractive option in which virtually 100% of patients would have a haploidentical familiar donor in a very short period of time. In the first years of haploidentical transplantation, T cell depletion strategies of the transplant product were employed to manage acceptable rates of graft versus host disease (GVHD) and rejection. T cell depletion determined a poor and delayed immune reconstitution that lead to infectious complications and worst outcome. In the last years new GVHD prophylaxis modalities have made possible to do non-manipulated haploidentical transplantation,

without T depletion, with excellent clinical results in terms of GVHD rates and infectious complications, probably due to a better immune reconstitution.

Objectives and design:

The present study has the aim to go in depth in the knowledge of immune reconstitution after a haploidentical non-manipulated transplantation with postransplant cyclophosphamide as GVHD prophylaxis.

The project was designed as an observational prospective study with two comparative arms: a group of haploidentical transplantation patients and a control group of familiar HLA identical transplantation patients. Immune reconstitution was measured in different time points (+15, +30, +60, +90, +180, +360 days postransplant) by means of quantification and phenotypic characterization of lymphoid subpopulations by flow cytometry and serum quantification of IgG, IgM and IgA immunoglobulins.

Results and conclusions:

30 consecutive patients were included in non-manipulated haploidentical transplantation group and 8 familiar HLA identical transplantation patients in control arm. Both arms were not statistically different in terms of clinical characteristics, except for GVHD prophylaxis, GVHD rates, and days for hematopoietic engraftment. These differences were the expected between the two different types of transplantation.

Immune reconstitution in the haploidentical group was worse than in control group in the first month in all the relevant B and T lymphoid subpopulations studied.

The first lymphoid subpopulation to recover in haploidentical group were NK cells, which reached normal levels between one and three months postransplantation. Their maturation pattern was delayed comparing with control group. T CD8+ lymphocytes recovered fast from day +90 on, and were in normal levels 6 months postransplant. T CD4+ lymphocytes, however, showed a slow recovery and needed one year to reach the normality.

Haploidentical patients had an adequate thymic origin reconstitution from day +180 on, although worse than control group, especially on what concerns to CD4+ lymphocytes.

Regarding the poor CD4+ reconstitution in general, a surprising good T regulatory CD4+ cell recovery must be highlighted.

B cell reconstitution was adequate in the haploidentical group, without any statistical difference with the control group from day +30 on. Sequence and periods of recovery of serum immunoglobulines was in the study group similar to the control group and what is described in literature for conventional transplantation. IgM was the first to recover, followed by IgG and finally IgA.

Patients with acute GVHD in the haploidentical group showed worst thymic immune reconstitution, worst early T regulatory cells, and a delayed NK cell maturation.

No statistically significant differences between patients with or without CMV reactivation were observed in lymphoid subpopulations in the haploidentical group, except for a CD8+ cytotoxic response in affected patients.

Additionally, in survival analysis, a tendency was observed towards a better overall survival in patients with a better early lymphocyte recovery in terms of ALC30 (Absolute Lymphocyte count on day +30), T CD3+ lymphocytes counts per microliter on day +30 and CD4+ T lymphocyte counts per microliter on day +90. Patients with higher percentages of immature NK cells in the first month postransplant also showed better overall survival.

In conclusion, some differences are found between immune reconstitution following a haploidentical transplantation with postransplant cyclophosphamide and an HLA identical sibling donor transplantation. B and T lymphoid early recovery is significantly worse in haploidentical transplantation, especially in what concerns about T CD4+ lymphocytes. Nevertheless, T regulatory CD4+ cells are an exception and show a better reconstitution, perhaps because postransplant cyclophosphamide selectively respect this subpopulation. NK cells, which are thought to be relevant for the neoplastic disease control in this type of transplantation, recovers adequately but its maturation is delayed. Thymic function, necessary for medium and long term immune reconstitution is preserved in haploidentical transplantation. Therefore, although immune reconstitution

in haploidentical transplantation is inferior to control group, some especial characteristics as the good recovery of NK and T regulatory cells, and preservation of thymic activity could be responsible for the positive results of this type of transplantation in terms of low GVHD rates, infectious complications, and survival. Therapeutic targets for cellular therapy as NK infusions are outlined by the differences observed in immune reconstitution of the haploidentical setting. The observations of some special features of lymphoid recovery in patients who develop active GVHD in the haploidentical group could be of clinical interest to predict and treat this complication in haploidentical patients. Small sample size is a limitation of this study to detect statistically significant differences, but our analysis reproduce previous reports about a strong relationship between early immune reconstitution and survival in haploidentical transplantation.

All these observations support the future development of additional studies of phenotypic and functional characterization of lymphoid subpopulations and its relationship with clinical outcome in non manipulated haploidentical stem cell transplantation with postransplant cyclophosphamide.

Introducción

3. Introducción

3.1. Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

3.1.1. Fundamentos e indicaciones. Fuentes de progenitores.

Acondicionamiento.

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (Alo-TPH) se basa en tres conceptos: la sustitución de una médula “enferma” por una sana, la posibilidad de recibir un tratamiento antineoplásico previo a dosis elevadas y altamente mielosupresoras, y el efecto alogénico antitumoral (llamado efecto injerto contra tumor) basado en gran parte en la disparidad HLA entre donante y receptor y la respuesta linfocitaria que esta conlleva, y que normalmente es paralelo a la producción no deseada de enfermedad injerto contra receptor (EICR)(1).

En los años 50 el Dr. E. Donnall Thomas realiza los primeros trasplantes alogénicos de progenitores hemopoyéticos en humanos (2), por lo que más tarde recibe en 1990 el premio Nobel de Medicina. Otros científicos europeos fueron también pioneros de esta modalidad terapéutica inicialmente aplicada a las víctimas de accidentes nucleares durante los años 50 y 60(3,4). El descubrimiento y desarrollo de los conocimientos sobre el sistema HLA, la EICR, y el uso de inmunosupresores posibilitan la publicación en 1977 de los resultados alentadores de los primeros 100 Alo-TPH para el tratamiento de la Leucemia Aguda (1).

Las indicaciones de este procedimiento se han ido ampliando con los años y en la actualidad comprenden una larga lista de patologías hematológicas neoplásicas, insuficiencias medulares y patologías congénitas severas (1).

Las principales fuentes de progenitores hemopoyéticos para trasplante han ido variando a lo largo del tiempo. Clásicamente se obtenía médula ósea en quirófano a través de la punción directa de cresta iliaca del donante. El descubrimiento de que el uso de agentes

movilizadores permite la salida de las células pluripotenciales de la médula ósea a la sangre periférica, donde pueden ser recogidas mediante procedimientos de aféresis, permite realizar el primer TPH de sangre periférica en el año 1989 (5). A partir de entonces, su uso ha sido exponencial, y ya en el año 2005 el 74% de los Alo-TPH europeos utilizan sangre periférica movilizada como fuente de progenitores (6). La principal ventaja del uso de médula ósea frente a la sangre periférica movilizada es la menor incidencia de EICR crónica (7,8), por lo que su uso ha quedado fundamentalmente limitado a enfermedades no malignas y a la aplasia medular.

En los años 80 se observa la presencia de células progenitoras hemopoyéticas en la sangre de cordón umbilical (SCU), por lo que esta se perfila como otra posible fuente para trasplante. En el año 1989 E. Gluckman lleva a cabo el primer trasplante hemopoyético de SCU con éxito, y en la actualidad esta modalidad de trasplante se presenta como una alternativa eficaz ante la ausencia de un donante adulto (9–11).

Para hacer posible el prendimiento de la hemopoyesis del donante, el paciente recibe un régimen de acondicionamiento previo al trasplante alogénico, que debe cumplir 3 características principales (1): 1. Capacidad para el control de la enfermedad de base; 2. Toxicidad o morbilidad asociada aceptable; 3. Efecto inmunosupresor, que evita el rechazo del trasplante por reacción inmune del huésped contra los progenitores hemopoyéticos del donante.

Según su intensidad y finalidad predominante el acondicionamiento puede ser de 2 tipos, mieloablativo y no mieloablativo. Los acondicionamientos mieloablativos, con mayores dosis quimioterápicas y mayor toxicidad, tienen mayor potencia en la erradicación de los clones malignos. Los regímenes no mieloablativos, de menor intensidad, aunque tienen menos capacidad para controlar la enfermedad maligna, basan su eficacia antitumoral en la alorreactividad del injerto contra el receptor, e incluyen sobre todo fármacos inmunosupresores que permiten un prendimiento progresivo de los progenitores hematopoyéticos alogénicos con una mínima morbilidad

(12,13). De este modo, los acondicionamientos mieloablativos son más adecuados para pacientes jóvenes con buen estado basal y enfermedades de base con peor respuesta pre-trasplante o mayor riesgo de recaída. Los acondicionamientos submieloablativos, por el contrario, son de elección en paciente mayores, con peor estado basal y buena respuesta pretrasplante.

3.1.2. Enfermedad Injerto contra Receptor.

La EICR es la complicación derivada del reconocimiento como extraños de los tejidos del receptor por parte de las células inmunes del donante, y es la principal causa de morbilidad y mortalidad inherente al procedimiento del Alo-TPH (1). Clásicamente se acepta que la EICR será más grave cuanto mayor sea la diferencia en el sistema HLA entre donante y receptor.

La EICR se subdivide en aguda y crónica, según los síntomas del paciente y el tiempo de aparición antes o después de los 100 días postrasplante, si bien existen síndromes de superposición entre ambas (14).

La incidencia de EICR aguda clínicamente significativa (Grado clínico II-IV) está en torno al 40% en el trasplante alogénico convencional (1) y a pesar de los avances en su diagnóstico y tratamiento, es aún la mayor causa de mortalidad en los primeros 100 días postrasplante. Se desencadena por un daño inicial de los tejidos debido a la quimioterapia de acondicionamiento, con una exposición explosiva de antígenos que deriva en la activación de las células presentadoras de antígeno del receptor y secundariamente de las células linfoides del donante infundidas con el injerto. Esta activación produce la liberación masiva de citoquinas inflamatorias como IL1 y Factor de Necrosis Tumoral alfa que dan lugar finalmente a la inflamación y necrosis de los tejidos afectados con participación de células T efectoras citotóxicas y NK (1). Los linfocitos T reguladores, escasos como veremos más adelante en fases tempranas postrasplante, son muy necesarios en el control de este efecto inflamatorio (15).

En un estudio reciente los factores de riesgo principales asociados al desarrollo de EICR aguda son el grado de diferencia HLA, el uso de un donante no emparentado y de irradiación corporal total en el acondicionamiento (16).

Los síntomas típicos de esta complicación son el rash cutáneo, náuseas y vómitos, diarrea, íleo y hepatitis colestásica. Para la gradación de la severidad de la EICR aguda se utilizan los criterios inicialmente descritos por Glucksberg (17) y mejorados por Przepiorka (18), que definen cuatro grados clínicos (I-IV) según la gravedad de la afectación cutánea, hepática y digestiva.

La EICR crónica es también una complicación de origen alorreactivo cuyo síndrome clínico solapa signos y síntomas característicos de enfermedades autoinmunes como la esclerodermia, la cirrosis biliar primaria, el síndrome de Sjögren o las miositis (14). Además se caracteriza por una alta incidencia de infecciones graves debidas tanto a la propia inmunosupresión del cuadro como a la producida secundariamente por su tratamiento. Aparece en aproximadamente 40% de los trasplantes de hermano idéntico, y hasta un 70% de los no emparentados (16). En su fisiopatología participan fundamentalmente linfocitos T alorreactivos pero recientemente también se ha descrito un importante papel de los linfocitos B (19). Los factores de riesgo para su desarrollo son EICR aguda previa, diferencia HLA, edad del paciente, seropositividad CMV, donante mujer en receptor masculino y uso de sangre periférica movilizada como fuente de progenitores (16). Para la EICR crónica, que clásicamente se clasificaba en limitada y extensa, el NIH americano estableció en 2005 tres grados de severidad (leve, moderado y severo), según los órganos afectados y la intensidad de la afectación (14). Por su relevancia clínica en el trasplante alogénico, las estrategias de prevención de la EICR son extremadamente importantes. La base de la profilaxis de la EICR es la inmunosupresión mantenida de las células T del donante peritrasplante, mediante el uso de fármacos inmunosupresores como inhibidores de la calcineurina (ciclosporina, tacrolimus), metotrexate, micofenolato y esteroides (20). El inconveniente de estos esquemas es que dificultan el efecto injerto contra tumor en la misma cuantía en que

disminuyen el efecto injerto contra receptor. Otra aproximación es la eliminación de las células linfoides T culpables de la EICR, bien in vivo mediante el uso de fármacos anti linfocito T (gammaglobulina antitimocítica y/o anticuerpos monoclonales como el Alentuzumab) o bien ex vivo mediante la “selección positiva” de las células madre hemopoyéticas CD34+ del injerto previa a la infusión. Estas estrategias producen una severa inmunosupresión T con una reconstitución inmune pobre y tardía que aumenta de forma significativa la severidad y frecuencia de las complicaciones infecciosas postrasplante (21,22).

En los últimos años, de la mano del trasplante haploidéntico no manipulado, la ciclofosfamida postrasplante (23) ha surgido como una nueva herramienta en la profilaxis de la EICR. Su principal ventaja es que utilizada a altas dosis en los días posteriores a la infusión del injerto destruye selectivamente aquellos linfocitos T alorreactivos que están proliferando tras el contacto con antígenos del receptor, y que van a producir la EICR aguda, sin afectar a los linfocitos menos alorreactivos. Gracias a éstos, teóricamente es posible mantener a medio plazo un mejor efecto de injerto contra tumor y una adecuada reconstitución inmune con protección antiinfecciosa.

Las formas leves de EICR no requieren tratamiento. Las moderadas y graves se tratan con fármacos y terapias inmunosupresoras e inmunomoduladoras como esteroides, inhibidores de la calcineurina, micofenolato, etanercept, gammaglobulina antitimocítica, células mesenquimales, fotoféresis extracorpórea, infusión de linfocitos T reguladores, etc (24,25). En general, la respuesta a los tratamientos iniciales ronda el 40-50% y aquellos pacientes refractarios o con formas muy graves tienen un pronóstico infausto, con hasta un 10-15% de supervivencia en algunas series (1).

3.1.3. Búsqueda de donante. Papel del HLA en el trasplante hemopoyético.

La identidad HLA es el requisito principal en la elección del donante, ya que es el factor determinante para que no se produzcan dos de las complicaciones más relevantes en

el trasplante alogénico, el rechazo y la EICR, debidas a la respuesta aloinmune de los linfocitos bien del receptor o del donante tras el reconocimiento de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad extraños.

El complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) está formado por 2 familias de moléculas de membrana (HLA clase I y clase II) codificadas en el cromosoma 6, cuya función es presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T para producir la respuesta inmune adaptativa. Los antígenos HLA de clase I se expresan en todas las células excepto los hematíes, y se codifican en 3 loci, HLA A, B y C. Son reconocidas por los linfocitos T citotóxicos. Las moléculas HLA de clase II se expresan solo en macrófagos, células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno, así como en endotelio y en linfocitos B, y se codifican en los loci HLA DR, DP y DQ. Interaccionan fundamentalmente con las células T helper o colaboradoras. El CMH está por lo tanto codificado en 12 genes HLA y dada la naturaleza codominante de estos, un individuo heterocigoto puede expresar hasta 12 antígenos HLA diferentes. Todos los loci que se encuentran en un mismo segmento del cromosoma 6 componen lo que llamamos un haplotipo, de forma que cada hijo hereda un haplotipo de cada uno de sus progenitores (26).

En general, en donantes emparentados, el tipaje de baja resolución de los antígenos HLA A, B y DR es suficiente para identificar los haplotipos heredados, y por lo tanto para identificar un potencial donante idéntico. El tipaje de alta resolución del resto de antígenos es fundamental cuando se busca un donante no emparentado.

Para un paciente con indicación de trasplante alogénico, el mejor donante es siempre, en primer lugar, un donante familiar HLA idéntico, pero esta situación solo se da en un tercio de los casos. Para los dos tercios restantes es preciso recurrir a la búsqueda de donantes no emparentados en los registros internacionales. El mejor donante no emparentado es aquel con identidad por alta resolución de los HLA A, B, C y DRB1, lo

que se denomina identidad 8/8. Más controvertida es la necesidad de incluir HLA DQB1 (identidad 10/10), aunque actualmente la mayoría de centros lo consideran (27,28).

La importancia de la identidad HLA en el trasplante no emparentado se pone de manifiesto en estudios del registro internacional del CIBMTR (Center for International Blood and Marrow Transplant Research), que demuestran en más de 8000 pacientes que a mayor disparidad HLA empeora el pronóstico tanto en enfermedad temprana como avanzada (20). Ver figura 1.

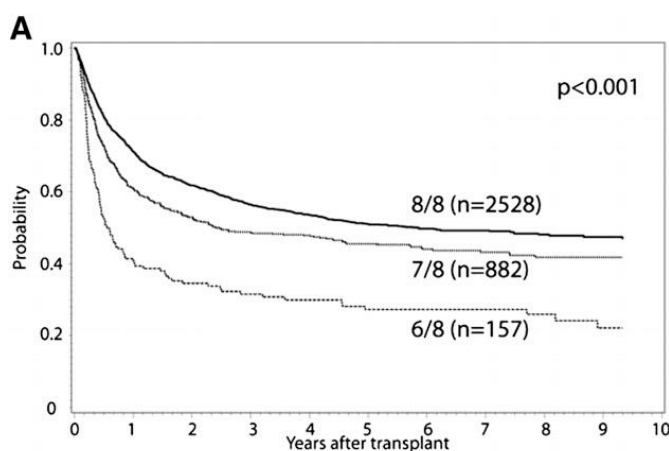


Figura 1. Probabilidad de supervivencia global en años postrasplante en enfermedad temprana según diferencias HLA. Original de Pidala y cols. (20).

Actualmente la probabilidad de encontrar en registros europeos un donante no emparentado con identidad 10/10 dentro de la raza caucásica es de un 60-80%, pero puede ser tan bajo como un 10-20% en las minorías étnicas (29), por lo que un número no desdeñable de pacientes finalmente no disponen de un donante adulto idéntico. En estos casos es necesario acudir a fuentes de progenitores alternativas como la sangre de cordón umbilical o el donante haploidéntico.

Adicionalmente, la búsqueda de un donante no emparentado adulto en los registros internacionales demora el inicio del trasplante de 3 a 6 meses de forma que esto constituye una limitación para los pacientes con indicaciones urgentes.

La sangre de cordón umbilical, aunque permite una búsqueda más rápida y mayor tolerancia en cuanto a la compatibilidad HLA tiene las limitaciones de la dosis celular

necesaria para la viabilidad del trasplante, la ausencia de una fuente para la inmunoterapia postrasplante, y una lenta reconstitución inmune.

Por todo ello, el donante familiar haploidéntico se perfila como una opción atractiva, disponible en virtualmente el 100% de los pacientes, y con las ventajas añadidas de una rápida disponibilidad, un coste más bajo al evitar el uso de los registros internacionales, y una fuente accesible para inmunoterapia postrasplante en caso de ser necesaria. Su principal limitación, sin embargo, es la disparidad HLA, que aumenta los riesgos de EICR y de rechazo, si bien debería disminuir la tasa de recaída por el efecto injerto contra tumor.

Desde los primeros trasplantes haploidenticos de los años 70, con inaceptables tasas de EICR severa y de rechazo (30), diversas estrategias se han ido desarrollando para conseguir moderadas tasas de EICR y un adecuado prendimiento manteniendo una aceptable incidencia de complicaciones derivadas de la inmunosupresión como las infecciones y la recaída de la enfermedad de base.

Con todas estas consideraciones, el algoritmo actual de búsqueda de donantes del grupo europeo EBMT (European Blood and Marrow Donor Transplantation) es el siguiente (26):

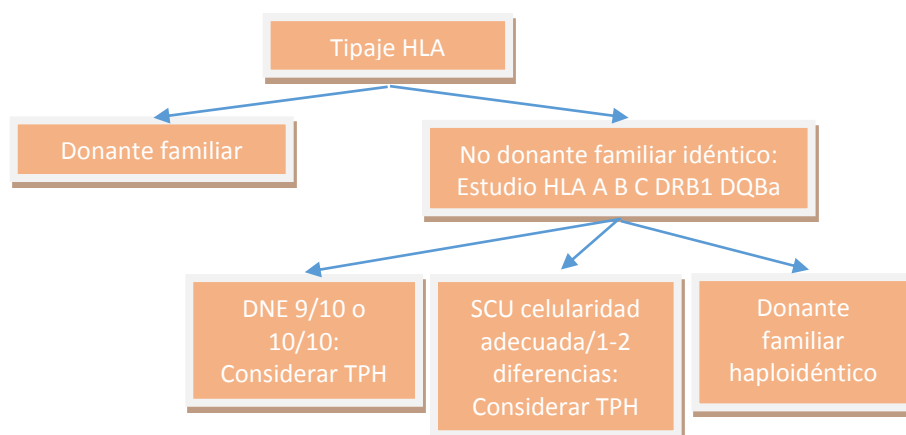


Figura 2. Algoritmo de elección de donante del grupo europeo de trasplante.

3.1.4. Trasplante haploidéntico. Evolución histórica.

En los años 90, con el objetivo de evitar las altas tasas de EICR del trasplante haploidéntico, se iniciaron procedimientos de selección celular in vitro para reducir la cantidad de linfocitos T del injerto. Este procedimiento incluye la selección positiva mediante columnas y bolas inmunomagnéticas marcadas con anti CD34+ de aquellas células que expresan este antígeno, despreciando las que no lo expresan. Utilizando esta estrategia, que consigue reducir los linfocitos T, B y NK del injerto en 3 o más logaritmos, el grupo de Perugia comunica sus resultados iniciales en leucemia aguda en 1994 (31). En 2005, con un protocolo más depurado, los mismos autores comunican mejores tasas de prendimiento, EICR y recaída, aunque con un 40% de mortalidad por infecciones oportunistas, debido a la pobre reconstitución inmune derivada de la escasa cantidad de linfocitos T infundidos (32). Con el objetivo de mejorar la reconstitución inmune este grupo ha implementado en los últimos años costosas estrategias como la infusión secuencial de linfocitos T reguladores junto con linfocitos T CD3+, lo que ha mejorado aún más sus resultados globales (33,34).

En este mismo sentido, otras técnicas de manipulación linfoide del injerto han obtenido buenos resultados, sobre todo en pacientes pediátricos, como la selección negativa secuencial con bolas inmunomagnéticas marcadas con CD3/CD19. Esta estrategia solo detrae del injerto los linfocitos T (CD3+) y B (CD19+), manteniendo la población NK y el resto de poblaciones celulares acompañantes (células dendríticas, monocitos, etc) (35).

En general, las estrategias cuyo objetivo es reducir la cantidad de linfocitos infundidos en el injerto conllevan una alta tasa infecciosa y una pobre reconstitución inmune. Por esto, en los últimos años, varios grupos de trasplante se han decantado por el trasplante haploidéntico no manipulado con estrategias adaptadas de prevención de la EICR.

Esta aproximación se basa en el uso de un trasplante haploidéntico no manipulado de médula ósea movilizada con G-CSF, acompañada de una intensa inmunosupresión posterior para conseguir tasas aceptables de EICR y evitar el fracaso del injerto. El uso de factores estimulantes de colonias previamente a la colecta de la médula ósea del donante aumenta la cantidad de células CD34+, disminuye los linfocitos totales y cambia el cociente T CD4+/CD8+ del injerto. El acondicionamiento es mieloablativo, y la profilaxis de la EICR se realiza con ATG de conejo, ciclosporina A, metotrexate y micofenolato. Tras demostrar la factibilidad de esta estrategia en 2002, con un buen prendimiento y una tasa de EICR aguda de 33% (36), en 2006 el grupo publica su experiencia en 135 pacientes con leucemia aguda, comparada con 158 tratados con un trasplante idéntico familiar convencional (37) (ver tabla 1). En este caso se combina un injerto de médula ósea con GCSF previo y sangre periférica movilizada, para mejorar el prendimiento. En general los resultados clínicos fueron comparables a pesar de mayores tasas de reactivación CMV y cistitis hemorrágica en el grupo haploidéntico.

Tabla 1. Resultados clínicos comparativos trasplante haploidentico frente a familiar idéntico protocolo GIAC (37)

	Haploidéntico	Familiar Idéntico
EICR aguda II/IV; III/IV	40%/16%	32%/11%
EICR crónica	55%	56%
Supervivencia global/Libre de enfermedad 1 año	71%/71%	72%/64%
Mortalidad no relacionada con recaída 2 años	22%	14%
Recaída	18%	13%
Reactivación CMV	65%	39%
Cistitis Hemorrágica	35%	13%

Este protocolo ha sido también adoptado de forma exitosa por otros grupos de trasplante hemopoyético como el de Roma (38,39)

Aproximación con profilaxis de la EICR basada en ciclofosfamida postrasplante. Hospital Johns Hopkins. Protocolo Baltimore.

Los primeros datos de que la ciclofosfamida puede actuar frente a los linfocitos T alorreactivos son aportados por Berenbaum en los años 60, que demuestra que este fármaco mejora la viabilidad de injertos cutáneos alogénicos (40). En el año 2001 Luznik evidencia además que es capaz de disminuir la incidencia de EICR letal en ratones trasplantados (41). La ciclofosfamida en altas dosis, infundida en una ventana corta postrasplante, (días +3,+4) consigue eliminar los linfocitos T alorreactivos que se encuentran en expansión, sin afectar a aquellos no alorreactivos, que están quiescentes, ni a las células hematopoyéticas infundidas. De esta forma teóricamente evitaría el desarrollo de EICR preservando la reconstitución inmune del paciente.

Los grupos del Hospital Johns Hopkins en Baltimore y el Fred Hutchinson Cancer Research Center en Seattle han liderado el desarrollo del trasplante haploidéntico no manipulado con ciclofosfamida postrasplante.

En el año 2008 Luznik y cols. publican los primeros datos en 68 pacientes con neoplasias hematológicas (42). El acondicionamiento se basa en el uso de fludarabina, irradiación corporal total y ciclofosfamida a dosis no mieloablativas, y la estrategia de profilaxis de la EICR incluye 2 infusiones de ciclofosfamida a altas dosis en los días +3 y +4 postrasplante, tacrolimus y micofenolato. La fuente de progenitores es médula ósea. Se objetiva una tasa de rechazo aceptable (13%), prendimiento de neutrófilos alrededor del día +15 y de plaquetas alrededor del día +24, y tasas de EICR aguda bajas (II-IV de 34%; III-IV 6%). La supervivencia global a los 2 años es del 36%, con una baja mortalidad relacionada con el procedimiento (15%), pero con tasas altas de recaída (51%). La supervivencia libre de enfermedad a los 2 años es del 26%. Las reactivaciones CMV son frecuentes (38%), y en cuanto a las infecciones oportunistas, se objetiva un 8% de Aspergilosis probada o probable. La patología linfoide obtiene mejores resultados que la mieloide.

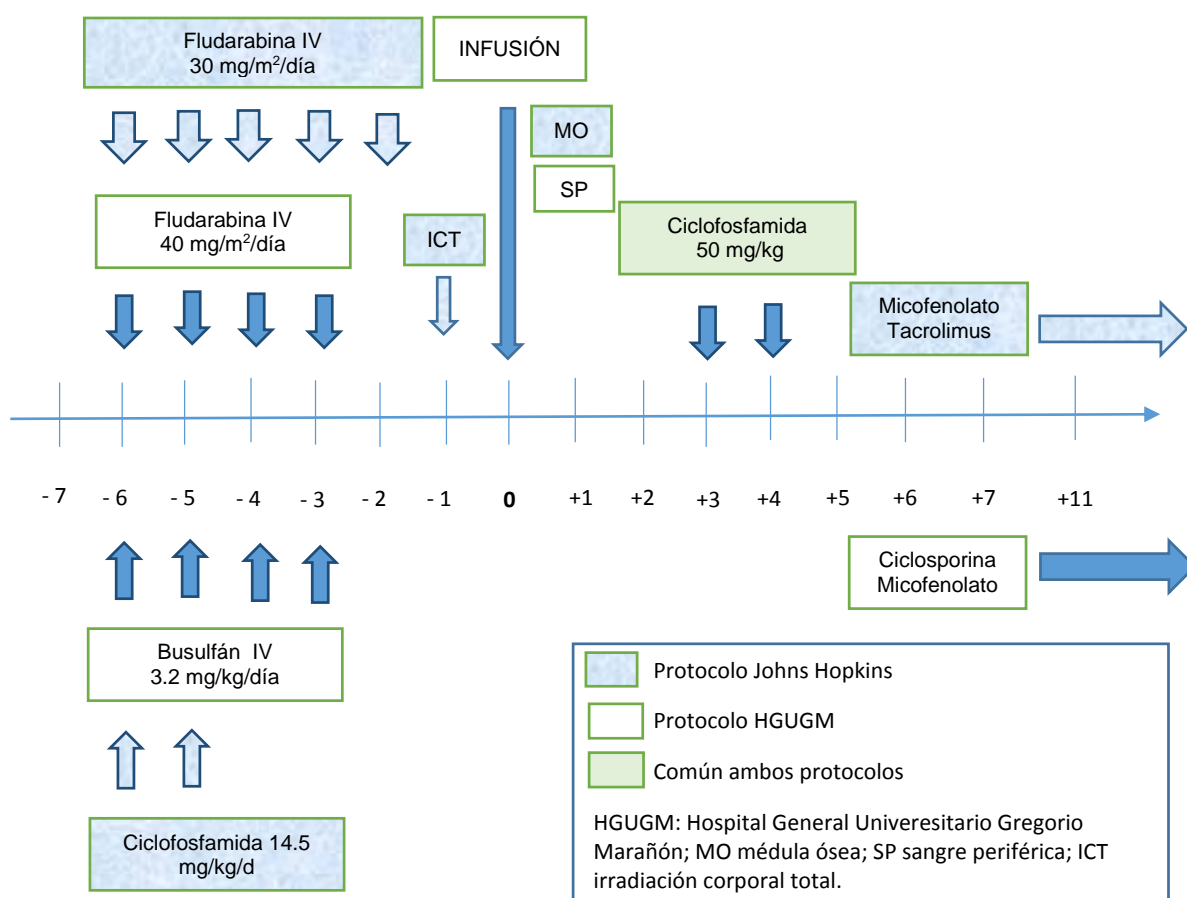
Ya tras los primeros análisis se intuye que este tipo de trasplante obtiene muy buenos resultados en pacientes con Linfoma de Hodgkin. En 2008 Burroughs confirma en 90 pacientes con este tipo de linfoma mejor supervivencia libre de enfermedad y menor recaída con trasplante haploidéntico no manipulado frente al trasplante familiar idéntico y de donante no emparentado (43).

En 2011 se comunica la experiencia pediátrica en 210 pacientes con acondicionamiento submieloablativo. La tasa de fracaso de injerto (13%), EICR aguda (32%) y crónica (13%) son similares a las conocidas en adultos, con escasa mortalidad relacionada con el procedimiento (18%) pero alta tasa de recaídas (55%). La supervivencia global y libre de enfermedad a los 3 años es de 41% y 32%. En este trabajo también se señalan las excepcionales tasas de éxito en los pacientes con Linfoma de Hodgkin, en los que se obtienen hasta un 62% de SG a los 3 años (44).

Dado que se observa de forma repetida que uno de los principales problemas es la alta tasa de recaídas, los grupos con experiencia en trasplante haploidéntico han ido evolucionando desde el uso de acondicionamientos de tipo submieloablativo a modelos mieloablativos en aquellos pacientes con alto riesgo de recaída subsidiarios de este tipo de trasplante.

En nuestra institución, los primeros trasplantes haploidénticos no manipulados con ciclofosfamida postrasplante se realizan de forma pionera en España a partir del año 2007, adaptando el original protocolo de acondicionamiento del grupo de Baltimore que incluía radioterapia hacia un protocolo de acondicionamiento basado únicamente en quimioterapia (busulfan) y cuya fuente de progenitores es fundamentalmente la sangre periférica excepto en casos seleccionados. Este protocolo adaptado se describe más adelante en material y métodos. La profilaxis de EICR se completa con ciclosporina a dosis convencionales y micofenolato. En la figura 3 se exponen gráficamente las principales diferencias entre el protocolo original y el protocolo adaptado de nuestro centro.

Figura 3. Protocolo original Johns Hopkins comparado con protocolo adaptado HGUGM.



Desde el año 2012 se han publicado varios trabajos comparando la aproximación de trasplante haploidentico no manipulado con ciclofosfamida postrasplante frente a otros tipos de trasplante haploidentico o al trasplante alogénico HLA idéntico. Ciurea y cols. (MD Anderson) comparan los resultados de 33 pacientes con trasplante haploidentico con selección positiva CD34+ frente a 32 con trasplante haploidentico no manipulado con ciclofosfamida postrasplante (45). El trasplante haploidentico no manipulado obtiene menor tasa de infecciones, menor rechazo y mejores tasas de supervivencia. Bashey y cols. en 2013 evidencian que el trasplante haploidentico no manipulado tiene resultados similares al trasplante alogénico HLA idéntico de donante emparentado y no emparentado (46), hecho que confirma en 2014 Di Stasi y cols. en 227 pacientes (47).

En conclusión, el trasplante haploidentico se está consolidando paulatinamente como una opción terapéutica en aquellos pacientes con neoplasias hematológicas con

indicación de trasplante y ausencia de donante HLA idéntico. A la vista de los últimos resultados incluso puede ser valorado como una opción alternativa al trasplante HLA idéntico de DNE en casos con ausencia de donante idéntico familiar e indicación urgente o en patologías seleccionadas como el Linfoma de Hodgkin.

3.2. Inmunidad y trasplante.

El éxito del trasplante alogénico depende del equilibrio dinámico que se establece entre las fuerzas inmunes del donante y el receptor. De la reacción del donante frente al receptor o “alorreactividad” se deriva un potente efecto inmunoterápico fundamental para el tratamiento de las neoplasias hematológicas, el efecto “injerto contra tumor” (ICT), que suele acompañarse del efecto adverso conocido como “enfermedad injerto contra receptor”, previamente descrito. De la reacción del receptor frente al injerto del donante (RCI) se deriva el posible “rechazo del injerto” en sus distintas presentaciones, primaria o tardía. Diversos factores influyen en este equilibrio de fuerzas inmunes como el acondicionamiento, la fuente de progenitores, los fármacos inmunosupresores, los linfocitos infundidos con el injerto, etc (figura 4).

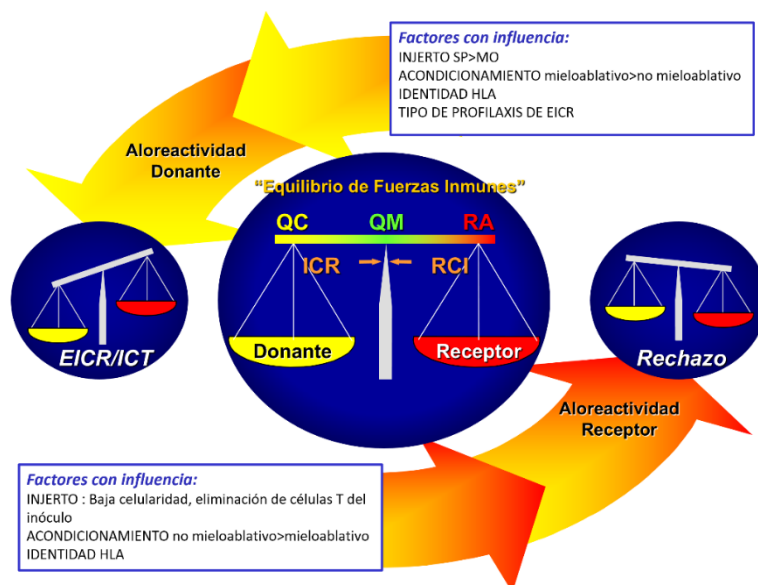


Figura 4. Representación gráfica del equilibrio de fuerzas inmunes en el trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos y factores influyentes. SP: sangre periférica, MO: médula ósea, QC: Quimerismo completo, QM quimerismo mixto, RA: reconstitución autóloga, ICR: Injerto contra receptor, RCI: Receptor contra injerto, , EICR: enfermedad injerto contra receptor, ICT: Injerto contra tumor.

Adicionalmente, el nuevo sistema inmune adquirido por el receptor tras el trasplante alogénico debe ser capaz de defender al paciente de las complicaciones infecciosas bacterianas, virales y fúngicas inherentes a este tratamiento.

La evaluación de la reconstitución inmune tras el trasplante hemopoyético y del equilibrio dinámico de fuerzas, por lo tanto, aporta gran cantidad de información relevante para el éxito del trasplante. Esta evaluación se hace fundamentalmente a través de la determinación del quimerismo hemopoyético y la caracterización cuantitativa y funcional de las subpoblaciones linfocitarias. En este sentido este trabajo se centra en el estudio de la recuperación inmune postrasplante en base a la medición de las diferentes subpoblaciones linfocitarias con relevancia clínica en el seno del trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos.

3.2.1. Sistema Inmune. Subpoblaciones linfocitarias relevantes.

Podemos subdividir el sistema inmune en 2 sistemas fundamentales, la inmunidad innata y adaptativa. En la tabla 2 exponemos las principales células implicadas y sus funciones.

Tabla 2. Inmunidad innata y adaptativa. Características y células implicadas.

Inmunidad	Innata	Adaptativa
Células implicadas	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Células NK ✓ Neutrófilos ✓ Monocitos ✓ Células dendríticas (CD) ✓ Macrófagos 	<p>Sistema linfoide:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Linfocitos B productores de anticuerpos ✓ Linfocitos T colaboradores CD4+: activan y regulan la respuesta efectora ✓ Linfocitos T citotóxicos CD8+: citotoxicidad directa
Función	<p>Inespecífica.</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Actúa sin presentación antigénica previa ✓ Primera barrera defensiva frente a antígenos desconocidos ✓ Producción de citoquinas ✓ Destrucción por citotoxicidad directa o fagocitosis ✓ Puesta en marcha de la inmunidad adaptativa 	<p>Antígeno-específica.</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Desencadenada por la presentación de un antígeno por las células presentadoras (CD) a través del complejo mayor de histocompatibilidad. ✓ Produce: <ul style="list-style-type: none"> • Respuesta efectora frente al antígeno: Linfocitos B: producción de anticuerpos • Linfocitos T: citotoxicidad directa. • Producción de células de memoria

En general, dentro de la respuesta inmune adaptativa, los linfocitos T y B tienen dos estadios madurativos, los linfocitos naïve, derivados de los órganos primarios de linfopoyesis, como son el timo en el caso de los linfocitos T y la médula ósea en el caso de los B, y que aún no han tenido contacto antigénico; y los linfocitos de memoria que tras el contacto antigénico en los órganos linfoides secundarios son linfocitos con capacidad de respuesta específica (48).

Los linfocitos T totales se dividen en linfocitos colaboradores o CD4+ y citotóxicos CD8+. La expresión intensa de HLADR+ y CD38+ en los linfocitos T se asocia con un estado de activación linfocitaria (49,50).

Dentro de los linfocitos T CD8+ citotóxicos, aquellos con expresión de CD57+ son los de mayor capacidad de lisis celular directa y los que morfológicamente se denominan Linfocitos Grandes Granulares por su amplio citoplasma con gránulos citotóxicos que contienen y secretan enzimas y citoquinas como la granzima y perforina (48). Así mismo aquellos linfocitos T CD8+ con expresión de CD28+ son de carácter más alorreactivo y citotóxico, ya que la interacción entre el CD28 linfocitario y el HLA B7 juega un importante papel en los procesos de reconocimiento alorreactivo y activación citotóxica de los linfocitos T CD8+. En cambio, los linfocitos T CD8+ sin expresión de CD28, tienen un perfil regulador o supresor, e intervienen en los procesos de control de la respuesta inmune no deseada lisando células dendríticas y linfocitos T CD4+ activados tras el contacto antigénico (51,52).

Los linfocitos T reguladores CD4+CD25+ también son fundamentales en los mecanismos de inmunotolerancia que previenen la aparición de una respuesta autorreactiva frente a antígenos propios. Esta subpoblación de linfocitos se caracteriza por un fenotipo CD127-/w, CD25++, CD4+ y por la expresión del factor de transcripción FoxP3 (53) y su función es controlar las respuestas autoinmunes, así como la proliferación linfoide en situaciones de linfopenia.

3.2.2. Reconstitución inmune en trasplante alogénico convencional.

3.2.2.1. Factores con influencia en la reconstitución inmune postrasplante.

Los factores que clásicamente influyen en la reconstitución inmune postrasplante son:

- Fuente de progenitores empleada:

- Médula ósea frente a sangre periférica movilizada (54). Los injertos de sangre periférica incluyen 10 veces más células linfoides T y B que los productos de médula ósea. Esto influye en la reconstitución del receptor, especialmente en lo que respecta a los linfocitos T CD4+, que son entre 2 y 4 veces mayores en los pacientes que reciben progenitores de sangre periférica.

-Sangre de cordón umbilical. La SCU contiene en general menor cantidad de células CD34+ y de células inmunes por kg de peso corporal del receptor que la médula ósea o la sangre periférica movilizada. Su cinética de prendimiento y de recuperación de neutrófilos es algo más tardía que el resto de fuentes de progenitores hemopoyéticos y ronda el día +30. Contiene además un mayor porcentaje de células linfoides naïve y células Nk inmaduras, sin experiencia inmunológica y con poca capacidad inicial de respuesta inmune. Esto, junto a la presencia abundante de linfocitos T reguladores con alto potencial supresor (55), predicen una reconstitución inmune T lenta con escasa respuesta antigénica (56) y un mayor número de infecciones (57,58).

- Células inmunes en el injerto (54,59). Las células linfoides maduras infundidas con el injerto van a sobrevivir en el receptor durante largos periodos de tiempo (de meses a 1 año), mejorando los recuentos linfoides y la defensa frente a las infecciones en el paciente.

- Edad del receptor (59,60). La reconstitución inmune timo-dependiente comienza a partir de los 6 meses del trasplante, y se manifiesta por la aparición de recuentos

significativos de linfocitos T naïve y de un repertorio del receptor de célula T amplio. La capacidad tímica residual se relaciona fuertemente con la edad del paciente.

- Estado de seroconversión para CMV (61). Los donantes seropositivos para CMV aportan al receptor células linfoides específicas frente a este virus que derivan en menor tasa de reactivación CMV en aquellos pacientes CMV positivos.

- Presencia de Enfermedad Injerto Contra Receptor (59,62). La presencia de EICR produce daño tímico, por lo que aquellos pacientes con EICR activo no presentan aumento de linfocitos naïve ni mejoría en el repertorio T a partir de los 6 meses postrasplante. Además los fármacos inmunosupresores utilizados en su tratamiento también influyen en la mala reconstitución inmune de estos pacientes.

- Factores relacionados con el acondicionamiento. La intensidad del acondicionamiento puede influir en la reconstitución inmune, especialmente aquellos fármacos con actividad anti linfocito T y frente al timo, como por ejemplo el ATG. Bosch y cols. demuestran que los acondicionamientos con ATG producen una peor reconstitución T CD4+ a largo plazo, preservando la reconstitución NK, B y CD8+ (63). En general los acondicionamientos no mieloablativos producen menor daño tímico que aquellos mieloablativos y que aquellos que incluyen ICT, con mejor reconstitución de los linfocitos T naïve de origen tímico (64).

3.2.2.2. Reconstitución de la inmunidad innata.

Los neutrófilos suelen alcanzar niveles por encima de 500/ μ L aproximadamente en el día +14 tras un trasplante de sangre periférica, en el +21 tras un trasplante de médula ósea y algo más tarde en un trasplante de SCU (57).

Las células NK se recuperan de forma temprana tras un Alo-TPH, alcanzando niveles normales en el primer mes, y lo hacen fundamentalmente a expensas de una expansión inicial de las células NK inmaduras CD56^{bright}. Posteriormente, estas células CD56^{bright} comienzan a descender rápidamente, aunque pueden persistir por encima de niveles

normales hasta 1 año. Es por esta temprana recuperación por lo que a las células NK se les atribuye un papel en el control de la enfermedad residual tras el trasplante(65).

Las células dendríticas, sin embargo, tienen una recuperación lenta y no recuperan una buena funcionalidad hasta el año.

3.2.2.3. Reconstitución de la inmunidad adaptativa.

La recuperación de la inmunidad adaptativa B y T está en general retrasada tras el trasplante alogénico y puede requerir hasta 2 años para alcanzar recuentos normales y una funcionalidad completa. Esto es debido a una pobre timopoyesis inicial por el daño tímico del acondicionamiento, a la escasa cantidad de precursores linfoides infundidos con el injerto y la pobre función tímica residual del adulto.

Recuperación linfoide T

En los primeros 6 meses postrasplante la reconstitución linfoide T se realiza de forma timo-independiente a través de un mecanismo de “expansión homeostática del compartimento periférico” por proliferación rápida de las células linfoides T maduras residuales del paciente y/o las infundidas con el injerto. Este mecanismo se asocia a un cambio de fenotipo en las células linfoides de sangre periférica, en el que predominan las células activadas y de memoria sobre las naïve. La IL7 e IL15 son las interleucinas más relevante en este proceso. La IL7 estimula la expansión de células T CD4+ y CD8+ naïve y permite su supervivencia, mientras la IL15 estimula la producción de células de memoria CD8+. En general ambas se encuentran aumentadas en situaciones de linfopenia como es el trasplante hemopoyético. Posteriormente, por un mecanismo de consumo, la propia expansión linfoide consume estas citoquinas para controlar la proliferación. Así, en las primeras semanas se observa una expansión rápida de células de memoria CD8+, con una expansión T CD4+ mucho menor, lo que invierte el cociente CD4+/CD8+, que luego disminuirá durante los primeros 3-6 meses. Sin embargo, la

respuesta inmune generada por estas células tendrá un repertorio de reconocimiento antigénico limitado (66,67).

Esta rápida y explosiva expansión está regulada y controlada por factores como el TGFbeta, que antagoniza a la IL15 y por los linfocitos T reguladores (68), que proliferan rápidamente en el primer mes, aunque están disminuidos en los primeros 6 meses.

Adicionalmente a la proliferación “homeostática”, que es antígeno independiente, se describe una proliferación llamada “endógena” de este compartimento linfoide T periférico dirigida por la estimulación antigénica (69). Este hecho se pone de manifiesto por ejemplo cuando se objetiva una expansión desproporcionada de linfocitos T CD8+ postrasplante en aquellos pacientes seropositivos para CMV. Este tipo de proliferación dirigida permite una inmunidad específica temprana frente a determinados antígenos en el periodo postrasplante.

En la tabla 3 se resumen los principales rasgos distintivos de la recuperación inmune precoz postrasplante.

Tabla 3. Características de la reconstitución inmune temprana no timo-dependiente.

- ✓ *Predominan las células T activadas y de memoria sobre las naïve (de origen tímico)*
- ✓ *Los recuentos totales suelen estar disminuidos los primeros 3-6 meses postrasplante.*
- ✓ *Los TRECS se mantienen bajos los primeros 3-6 meses*
- ✓ *Hay una expansión temprana y rápida CD8+ en las primeras semanas*
- ✓ *Se observa un Cociente CD4+/CD8+ invertido, ya que la renovación T CD4+ es más lenta y deriva fundamentalmente de la timopoyesis*
- ✓ *Hay depleción de los linfocitos T reguladores.*
- ✓ *Ambiente propenso al desarrollo de EICR y de infecciones oportunistas (57,65)*

A partir de los 6 meses se comienza a apreciar una reconstitución inmune de origen tímico. La timopoyesis va a producir Linfocitos T CD4+ naïve, CD8+ efectores citotóxicos y Linfocitos T reguladores CD4+CD25+CD127-/+/débil.

Inicialmente los precursores T del inóculo migran al timo. Allí se expanden, maduran y adquieren un receptor de célula T (Tcr) específico por reordenamiento de los genes VDJ. Dentro del timo, los nuevos clones linfocitarios sufren una selección positiva y negativa para eliminar clones autorreactivos y favorecer la tolerancia inmunológica. Posteriormente estas células naïve migran a la sangre periférica y tejidos donde se convierten en células de memoria y efectoras. Las células derivadas de la reconstitución inmune producida por este mecanismo tendrán un repertorio de reordenamiento de receptor de célula T mucho más amplio, por lo que serán capaces de producir una respuesta inmune más adecuada y específica.

La actividad timopoyética postrasplante se mide por la determinación de TRECS (TCR Rearrangement Escisión Circles), que son fragmentos de DNA derivados del reordenamiento de los genes VDJ, y por la cantidad en sangre periférica de linfocitos de fenotipo naïve (67).

La reconstitución inmune completa de origen timopoyético se retrasa hasta 1 año en niños, y hasta 3-5 años en adultos, pero puede continuar afectada hasta 20 años o indefinidamente según las características del paciente (65).

En la figura 5 y 6 se exponen de forma gráfica las características diferenciales de la reconstitución inmune temprana y tardía postrasplante.

Recuperación linfoide B

Tras un trasplante de progenitores hemopoyéticos, la recuperación linfoide B remeda a la ontogenia fisiológica durante los primeros años de vida (70).

Las células B se producen en la médula ósea a partir de los progenitores linfoides, que adquieren receptores tipo inmunoglobulina (IgM e IgD) por mutación somática. Estas células naïve migran al tejido linfóide secundario donde por interacción con las células T CD4+ y las células dendríticas presentadoras de antígeno sufren dos procesos: 1. Hipermutación somática de las zonas variables de las inmunoglobulinas, que les permite generar anticuerpos con alta afinidad en la unión con su antígeno ; 2. Cambio de isotipo por recombinación de los genes codificantes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, que les confiere la capacidad de expresar y producir receptores tipo inmunoglobulina de tipo IgG, IgA e IgE. Estas células maduras son las que se convierten en células B de memoria (no productoras de Ig) o células plasmáticas (productoras de Ig), que persisten para garantizar la inmunidad a largo plazo.

Tras un Alo-TPH, los recuentos de células B están muy disminuidos en los primeros meses, con un aumento posterior por encima de los niveles normales durante los primeros 1-2 años, de forma parecida a lo que ocurre en los primeros años de vida. El fenotipo inicial de las células B postrasplante es naïve, mientras que la reconstitución de las células de memoria puede tardar hasta 5 años postrasplante. En el mismo sentido, la primera Inmunoglobulina en recuperar niveles normales es la IgM (2-6 meses), posteriormente aparece la IgG (entre 3 y 18 meses) y finalmente la IgA (hasta 3 años). Los niveles de IgG pueden corresponder con la producción de las células plasmáticas residuales del donante, que persisten en el receptor hasta 2 años tras el trasplante (71).

A pesar de la expansión B, la capacidad funcional de estos linfocitos está comprometida en la mayoría de los casos durante los 2 primeros años. Esto ocurre en gran parte por la defectuosa inmunidad T, con insuficiente señalización T CD4+ para estimular la maduración de las células naïve (72). Todo esto deriva en una respuesta vacunal alterada en receptores de trasplante a pesar de niveles normales de células B (73).

Figura 5. Gráfico de la reconstitución inmune. Adaptado de Williams y cols (65).

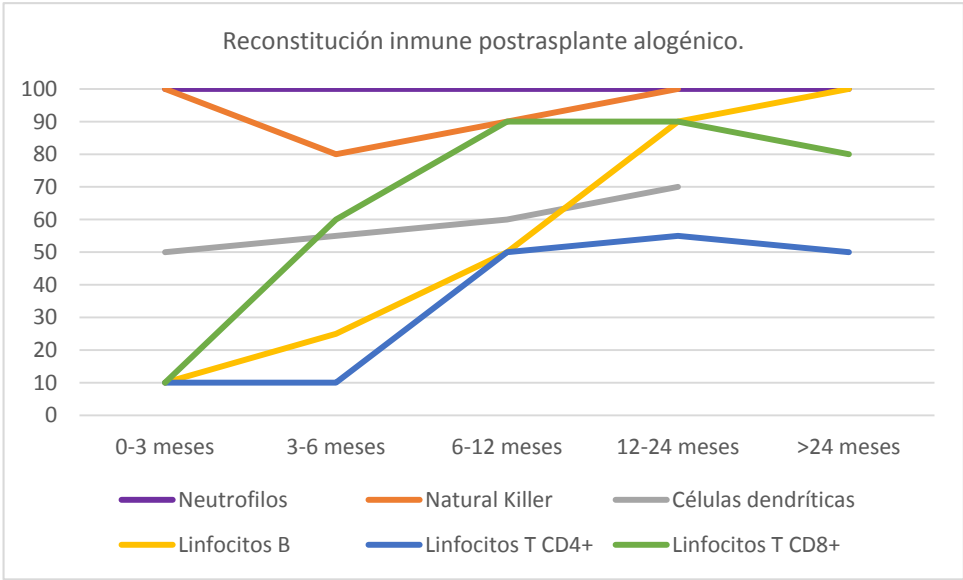
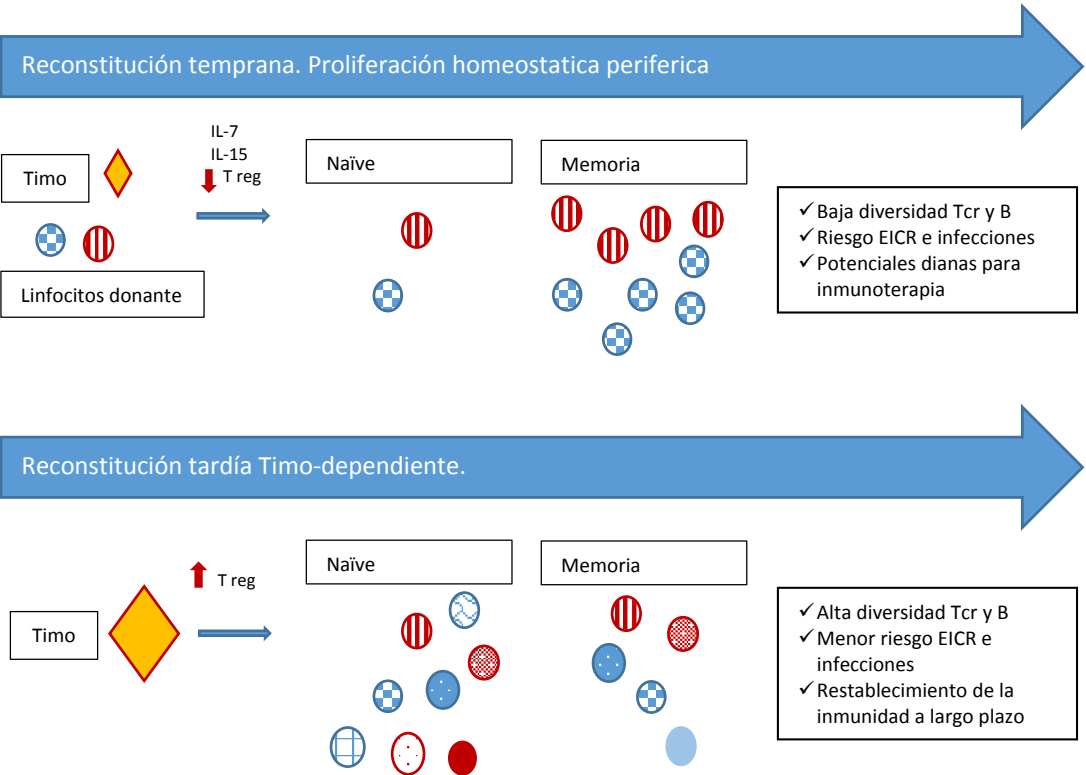


Figura 6. Gráfico de reconstitución inmune de las subpoblaciones linfocitarias post trasplante alogénico. Adaptada de Williams y cols (65). Eje vertical porcentaje de recuperación, eje horizontal meses postrasplante.

Relación entre reconstitución inmune, EICR y supervivencia.

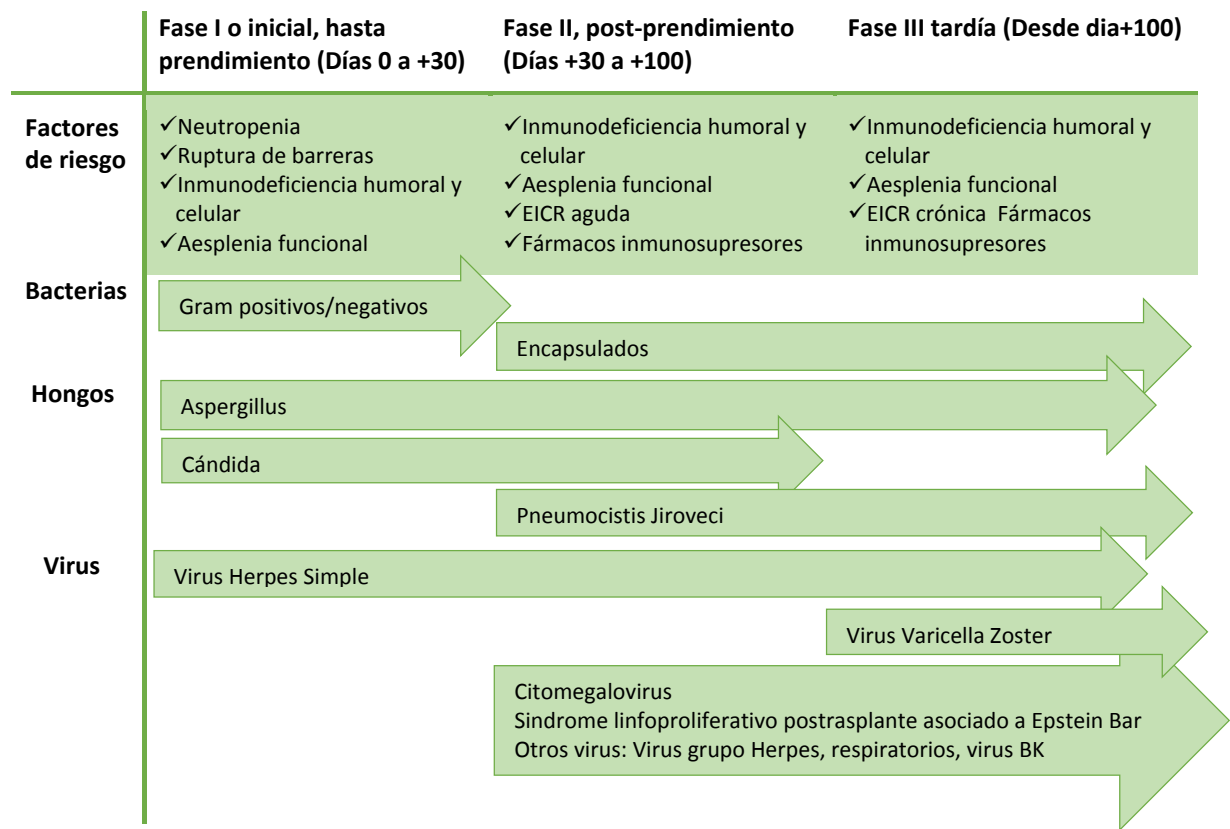
Las características de la inmunidad temprana postrasplante (escasos linfocitos CD4+ naïve, mayor cantidad de linfocitos citotóxicos T CD8+, escasos T reguladores, pobre repertorio antigénico), predisponen al desarrollo de EICR. Aquellos factores de control de la proliferación homeostática como las células T reguladoras previenen la EICR en modelos experimentales y ensayos clínicos (15,68). En la misma dirección, los defectos de funcionalidad tímica aumentan la incidencia de EICR aguda y crónica, e incluso se relacionan con una mayor mortalidad en series pediátricas (74) .

Algunos autores han relacionado la reconstitución inmune con el pronóstico general del trasplante en términos de supervivencia. Kim y cols. encuentran que aquellos pacientes con más de 200 linfocitos T CD4+ por microlitro a los 3 meses tenían mejor supervivencia global y menos mortalidad no relacionada con recaída (75). Berger y cols. confirman este hallazgo en 758 pacientes (76).

3.2.2.4. Complicaciones infecciosas en el trasplante de progenitores hemopoyéticos.

Las infecciones constituyen una de las principales complicaciones del trasplante hemopoyético y muy especialmente del Alo-TPH. Los factores de riesgo infeccioso son múltiples: estado de la enfermedad de base al trasplante, comorbilidades, grado de neutropenia, rotura de barreras naturales debido a la mucositis o al uso de catéteres centrales, presencia de EICR aguda o crónica activa, fármacos inmunosupresores, etc, pero sin duda el factor más relevantes va a ser la reconstitución inmune del paciente. Así el paciente trasplantado pasa por un periodo de inmunodeficiencia de duración variable entre meses y años, con tres etapas fundamentales que, según los defectos inmunes predominantes, condicionan diferentes riesgos infecciosos en cada una de ellas (77) (figura 6).

Figura 7. Principales fases de inmunosupresión postrasplante y riesgo infeccioso. Adaptada de Tomblyn y cols. (77)



La relevancia del CMV en el trasplante hemopoyético se pone en evidencia en muchos estudios. La seropositividad para CMV es un riesgo mayor de morbi-mortalidad, especialmente en pacientes que reciben un trasplante de un donante seronegativo que no le aporta linfocitos T CMV específicos (57,78). La reactivación CMV puede causar infecciones pulmonares, hepáticas, digestivas o del sistema nervioso central. Dada su relevancia se realiza un seguimiento estrecho de las copias de CMV en sangre periférica del paciente. Ante una reactivación, se procede a un tratamiento empírico precoz para evitar que se desarrolle la infección tisular.

Otra de las complicaciones infecciosas más temidas en el trasplante es la aspergilosis invasiva, observada en un 5-15% de los trasplante alogénicos. Aún tiene una alta mortalidad de hasta el 60%, a pesar de la evolución en los tratamientos antifúngicos, por lo que el uso de profilaxis adecuada es de vital importancia (79).

3.2.3. Reconstitución inmune en trasplante haploidéntico no manipulado. Datos publicados

Aproximación de la Universidad de Pekín, China. Protocolo GIAC.

Chang y cols. publican en 2012 los aspectos más relevantes de la reconstitución inmune del trasplante haploidentico no manipulado con médula ósea+sangre periferica primadas con G-CSF, según el protocolo GIAC (80). Analizan 50 pacientes frente a 25 que recibieron un trasplante familiar idéntico. Respecto a los datos clínicos, las tasas de prendimiento, EICR, recaída, supervivencia e infecciones bacterianas y fúngicas son similares en los 2 grupos, mientras que en el grupo haploidéntico se evidencia una mayor tasa de reactivación CMV (49% frente a 13%) que ya se observa en previas publicaciones.

Respecto a la reconstitución inmune, el grupo haploidéntico presenta menores recuentos de linfocitos T CD4+ durante los primeros 3 meses, con recuentos >200/ μ L a los 6 meses y similares a los del grupo de donante idéntico al año. Los linfocitos T CD8+, sin embargo, solo son menores en el grupo haploidéntico en el primer mes, con una rápida y explosiva expansión compensadora posterior, de forma que los recuentos son similares a los del grupo idéntico en el día +90. La expresión de CD28+ en los linfocitos T CD8+, relacionada con la presencia de aloreactividad, (80) fue menor en el grupo haploidéntico en el día 15, mayor a la del grupo idéntico en el día 30 y 90, y posteriormente igual en ambos grupos. No hay diferencias en la recuperación de monocitos y de células B.

Dadas las publicaciones previas que asocian la reconstitución inmune T CD4+ con la supervivencia, los investigadores comparan la evolución clínica de los pacientes con sus recuentos de CD4+ a los 3 meses, sin encontrar ninguna relación pronóstica.

Este mismo grupo, sin embargo, ha realizado previamente varias publicaciones (Chang 2009, 206 pacientes (81), Chang 2011 en 60 pacientes pediátricos (82)) en las que observan que aquellos pacientes con trasplante haploidéntico con un recuento absoluto de linfocitos en el día 30 (ALC30) mayor de 300/ μ L tienen mejor pronóstico en términos de menor recaída, menor mortalidad infecciosa y relacionada con el procedimiento, mejor supervivencia global y mejor supervivencia libre de enfermedad.

Buscando una relación entre reconstitución inmune y EICR en el trasplante haploidéntico, Chang y cols. demuestran en 43 pacientes que los linfocitos T totales y un mayor ratio T/NK en el día +14 son predictores independientes para el desarrollo de EICR aguda, mientras que solo el ratio T/NK en el día+14 predice la aparición de EICR crónica (83).

Aproximación con profilaxis de la EICR basada en ciclofosfamida postrasplante. Hospital Johns Hopkins. Protocolo Baltimore.

Existen pocos datos publicados sobre la reconstitución inmune en este tipo de trasplante haploidéntico.

Ciurea y cols. en 2012, en un artículo de comparación entre los resultados clínicos del trasplante haploidéntico no manipulado con ciclofosfamida postrasplante y el trasplante haploidéntico con procedimientos de selección publican algunos datos sobre la reconstitución inmune de ambos grupos (45). En líneas generales, como era esperado, la reconstitución T y fundamentalmente de CD4+ es mucho peor en el trasplante seleccionado en los primeros 6 meses y posteriormente se iguala, con una reconstitución linfocítica B similar en ambos (figura 8). La tasa de infecciones virales es 1.5 veces mayor en el haploidéntico seleccionado frente al no manipulado, así como las infecciones fúngicas, aunque con parecidas tasas de reactivación CMV y cistitis hemorrágica por virus BK.

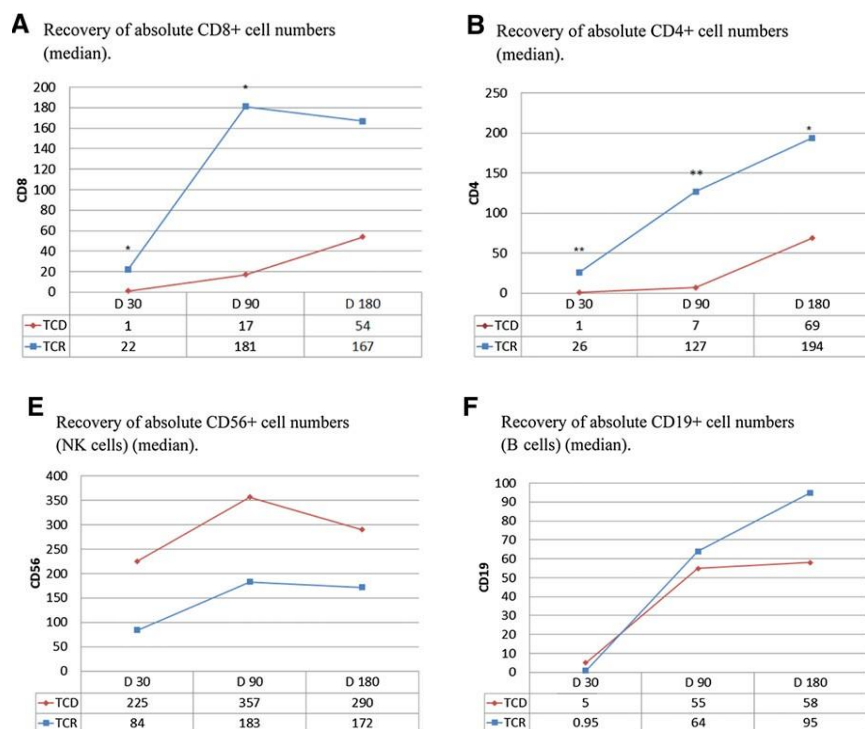


Figura 8. Original de Ciurea y cols. Recuperación de las subpoblaciones linfoides T tras un trasplante haploidéntico no manipulado (TCR) o con depleción T (TCD) (45). A. Reconstitución de linfocitos T CD8+. B. Reconstitución de linfocitos T CD4+. E. Reconstitución de células NK. F. Reconstitución de linfocitos B.

En otro de los artículos de comparación clínica del trasplante haploidéntico, en este caso frente al HLA idéntico familiar y de DNE, Di Stasi (2014) encuentra una reconstitución T peor en el trasplante haploidéntico frente al trasplante familiar HLA idéntico en el día 30 (medianas de 448/ μ L en familiar HLA idéntico, 111/ μ L en DNE y 71/ μ L en haploidéntico), con predominio de los linfocitos T CD8 positivos, y similar reconstitución B (47) (figura 9).

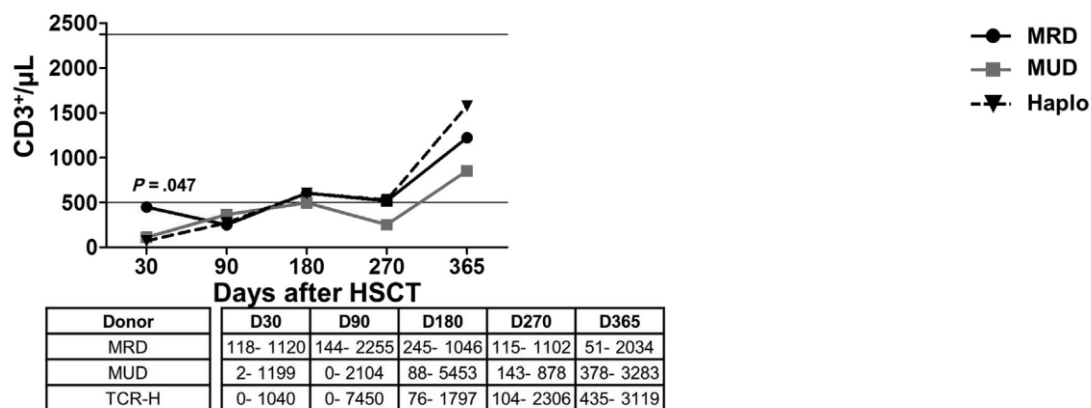


Fig 9. Reconstitución inmune de linfocitos T en trasplante haploidéntico frente a donante HLA idéntico emparentado y no emparentado. Original de Di Stasi et al (47).

El resto de datos publicados a este respecto se encuentran en diferentes comunicaciones enviadas a las principales reuniones internacionales de hematología. Cabe destacar lo comunicado por Symons y cols en 2011 (grupo Johns Hopkins) al Congreso Americano de Hematología con 53 pacientes a los que se realiza trasplante haploidentico no manipulado con acondicionamiento no mieloablativo (84). En este análisis se objetiva una aceptable reconstitución inmune, con predominio de los linfocitos de memoria sobre los naïve y los linfocitos de origen tímico CD31+. Los linfocitos T CD4+ superan los 120/ μ L en el día +60 y los 220/ μ L en el día +180. En 10 pacientes se pudo estudiar el repertorio del receptor de célula T, y se demuestra que aquellos sin recaída, sin EICR significativa y sin infección viral activa tienen una buena reconstitución T con amplio repertorio, a partir de los 6 meses. Aquellos con cualquiera de estas complicaciones presentan peor reconstitución a este nivel. La respuesta específica frente a CMV es adecuada en el 70% de los pacientes en el día +60. El mismo grupo comunica en el Congreso Europeo de Trasplante datos similares (85) así como un análisis en el que aquellos pacientes con ALC30>200 / μ L demuestran tener mejor supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad.

Dominieto et al, también en 2011, realiza una comunicación comparando las poblaciones linfoides básicas de la reconstitución inmune en trasplante haploidentico no manipulado (40 pacientes), trasplante de donante familiar HLA idéntico y trasplante de DNE y sugiere que la reconstitución del trasplante haploidentico no manipulado es peor que la del trasplante familiar HLA idéntico y similar a la del DNE (86).

En el año 2012 Di Stasi (MD ANderson) apoya esta sugerencia en una nueva comunicación en el Congreso Americano de Hematología y defiende que la reconstitución inmune T de los trasplantes haploidenticos (28 pacientes) no manipulados es similar a la del DNE, con menos linfocitos T y CD4+ en los primeros 3 meses y menos linfocitos naïve en los primeros 6 meses que aquellos pacientes que reciben un trasplante de donante familiar HLA idéntico (87).

Todos los datos tanto publicados como los comunicados a congresos incluyen únicamente pacientes que reciben médula ósea como fuente de progenitores en los grupos de trasplante haploidéntico no manipulado estudiados, sin embargo, la corriente actual en nuestro medio en este tipo de trasplante es la utilización cada vez más frecuente de los progenitores hematopoyéticos obtenidos de sangre periférica movilizada.

Nuestro grupo también comunica en 2012 una comparación de la reconstitución inmune basada en la medición de las poblaciones básicas linfoides T, CD4+, CD8+, NK y B en 22 pacientes con acondicionamiento mieloablativo y no mieloalativo, sin objetivar diferencias significativas en la reconstitución linfóide según el acondicionamiento empleado (88).

3.2.4. Papel de las células NK en el trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos.

Las células NK, producidas y maduras en la médula ósea, forman parte de la inmunidad innata del organismo y sus funciones incluyen (89):

- ✓ Citotoxicidad directa
- ✓ Citotoxicidad dependiente de AC (ADCC)
- ✓ Secreción de citoquinas reguladoras del sistema inmune
- ✓ Asistencia inmunológica para la regeneración de tejidos en barreras mucosas

Las células NK se definen por la expresión de los antígenos de superficie CD56+ y NKp46, y por la ausencia de expresión del antígeno de línea linfóide T CD3. Existen diversas subpoblaciones NK con distintas funciones y diferentes características de expresión fenotípica. Los receptores de superficie que expresan las células NK se subdividen en:

a) Receptores de tipo inmunoglobulina o KIR, que pueden ser activadores o inhibidores.

b) Receptores Lectina heterodiméricos tipo C: NKG2A, B, C y D. El NKG2A, B y C forman heterodímeros con el CD94. NKG2A y B son activadores, C inhibidor. El NKG2D, receptor inhibidor, se expresa como un homodímero.

c) Receptores de toxicidad natural, todos activadores, entre los que destaca NKp30, NKp 46 y NKp 44.

Cada uno de estos receptores tiene unos ligandos específicos con los que interacciona, que son en su mayoría moléculas HLA, y se relacionan con diferentes funciones (tabla 4).

Tabla 4. Receptores de células NK y principales funciones

KIR (receptores Killer Ig Like)		
KIR inhibidores KIRDL1; KIRDL2; KIRDL3; KIRDL5; KIRDL7 KIR activadores KIRDS1; KIRDS2 KIRDL4	Regulan interacción de los NK con otras células	
	Actúan en procesos de reconocimiento de células propias frente a extrañas y en la distinción de células sanas y enfermas	
	Tienen también importancia en actividad antiviral, anti CMV (90) y antitumor (91).	
Receptores Lectina heterodiméricos tipo C –Inhibitorios		
CD94/NKG2A	Marcador inmaduro	Regulan las interacciones de los NK con células diana
NKG2D	Media en efectos antitumor (92).	
Receptores Lectina heterodiméricos tipo C –Activadores		
CD94/NKG2C	Importancia en defensa anti CMV (93).	Regulan las interacciones de los NK con células diana
Receptores de citotoxicidad natural (NCR)-Activadores		
NKp30/ NKp46	Se expresan constitutivamente en NK	Papel importante en respuesta antitumoral
NKp44	Requieren activación por IL2 para expresarse	

Basadas en sus características madurativas se diferencian 2 grandes subpoblaciones:

- Células NK CD56^{bright}. Suponen un 10% de las células NK en condiciones normales y presentan un fenotipo inmaduro con que se caracteriza por una expresión brillante o intensa de CD56 y alta expresión de CD 94/NKG2A. Son células encargadas de producir citoquinas inmunorreguladoras y probablemente son las precursoras de los NK CD56^{dim}. Expresan receptores de alta afinidad

para IL2. Aunque se les presume una función más reguladora que citotóxica, estimuladas por IL2 o IL12 poseen capacidad citotóxica similar a las CD56^{dim}.

- Células NK CD56^{dim}. Son la subpoblación mayoritaria y suponen un 90% del total de células NK. Tiene fenotipo maduro y expresan el resto de marcadores KIR, NKG2C, NKG2D, etc. Son más efectivas que las anteriores en citotoxicidad directa (producen granzyma B, perforina, FasL, TRAIL) o mediada por anticuerpos. Expresan receptores de afinidad media a estimulación por IL2, por lo que no son tan dependientes de esta citoquina para su función citotóxica.

El proceso madurativo NK o de “educación” es fundamental para asignar a cada subpoblación NK sus propias funciones efectoras. Este proceso depende de la expresión de KIR inhibitorios y su interacción con sus ligandos HLA de las células del estroma medular. Esta interacción crea en los NK un “umbral de activación” y a la vez confiere a cada célula un “potencial citotóxico” fijo. Una vez que se ha producido su maduración, cuando no hay expresión de estos ligandos HLA en las células que contactan con el linfocito NK, este se activa e inicia la citolisis. Si no se produce este proceso de “educación” la célula NK no tendrá un buen potencial citotóxico, será tolerante e inactiva (94).

Las investigaciones sobre la maduración de los NK del donante en el receptor tras un trasplante de médula ósea han permitido un mayor conocimiento de la ontogenia NK. La maduración fenotípica postrasplante de los NK tiene un patrón específico, aunque puede estar modulado por los receptores KIR, infecciones, citoquinas, etc. Inicialmente se produce una expansión de NK CD56^{bright}, de fenotipo inmaduro, con alta expresión de NKG2A/94, y posteriormente adquieren la expresión de los receptores KIR, NKG2C, 2 D. La maduración o “educación” se realiza por interacción de las células NK del donante con las células estromales de médula ósea del receptor. Entre 6 meses y 1 año el fenotipo NK del receptor es normal, similar al del donante.

La inhibición de las células NK por HLA autólogos puede constituir un mecanismo de escape de las células tumorales. En el trasplante haploidéntico, gracias a la disparidad

HLA, teóricamente existe un gran potencial de aloreactividad y citotoxicidad mediada por NK, que viene modulada por las características fenotípicas de donante y paciente y sus interrelaciones.

La aloreactividad NK en el contexto del trasplante se puede valorar de diversas formas. El mecanismo más admitido es que la aloreactividad es mayor y por lo tanto debe haber mejor efecto injerto contra tumor cuando hay diferencias en los ligandos KIR, es decir cuando el donante posee moléculas HLA (ligandos KIR) que no están presentes en el receptor. Ruggeri y cols. demuestran en pacientes con leucemia mieloide aguda y trasplante haploidéntico manipulado que aquellos con diferencia de ligandos (HLA) tienen ventaja en la supervivencia global (95). Willemze confirma estos hallazgos en el contexto del trasplante de SCU (96). En otros tipos de trasplante, como el trasplante de DNE los resultados han sido más dispares. Algunos grupos observan ventaja en la supervivencia (97) mientras que otros no encuentran diferencias (98). En la mayoría de los estudios, sin embargo, aquellos pacientes con diferencias o “mismatch” tienen más EICR aguda y menor riesgo de recaída (95–97).

Otra aproximación para la valoración pronóstica se basa en el estudio del genotipo KIR de donantes y pacientes, tanto para la búsqueda de diferencias o “mismatch” como para la consideración del tipo de haplotipo NK A o B. El haplotipo A contiene sobre todo KIR inhibidores y una mínima cantidad de activadores, y es el que se encuentra en un 60% de la población caucásica. El haplotipo B contiene múltiples receptores activadores e inhibidores. Cooley y cols. demuestran en pacientes con leucemia mieloblástica y trasplante HLA idéntico de DNE que aquellos que reciben un trasplante de un donante con haplotipo B tienen mejor supervivencia libre de recaída (99).

Las células NK también son relevantes para la inmunidad antiviral, como se demuestra por la alta incidencia de infecciones graves en las deficiencias congénitas de células NK. En modelos murinos se ha demostrado que las células infectadas por CMV expresan en superficie proteínas virales semejantes a antígenos HLA de clase I que interaccionan con los receptores NK, de modo que estos intervienen en el control de la

infección, más efectiva si la interacción predominante es con receptores de tipo activador (100). En el contexto del trasplante hematopoyético numerosas publicaciones reportan menor incidencia de reactivación e infección CMV en los pacientes que reciben trasplantes de donantes con mayor número de receptores activadores (101,102). En especial, el receptor NKG2C tiene un importante papel en el control del CMV y su expresión aumenta tras la exposición a este virus, tanto en pacientes no trasplantados (103) como en pacientes trasplantados (93). También se ha descrito un papel directo de las células NK productoras de IL22 presentes en el pulmón en la inmunidad frente al virus influenza. La hemaglutinina expresada en la superficie de células infectadas interacciona con el receptor NKp46, produciendo liberación de interferón así como citolisis directa (104).

En los últimos años se postula que las células NK intervienen en los procesos de inmunidad asociada a mucosas y de regeneración tisular. Esto es relevante en el trasplante hematopoyético ya que la mucositis y la EICR se caracterizan por una importante destrucción de la barrera mucosa y epitelial de los pacientes. Numerosos estudios describen que las células NK de las mucosas producen IL22, citoquina implicada en la regeneración tisular epitelial y que además estimula la producción de proteínas antimicrobianas por parte de estas células (105).

Las células NK también pueden potencialmente intervenir en los mecanismos relacionados con la producción y regulación de la EICR. Varios hallazgos hacen pensar que las células NK podrían controlar la activación linfocitaria y de este modo reducir la EICR por diversos mecanismos. En un modelo murino se demuestra la capacidad de las células NK para la lisis de células T CD4+ crónicamente activadas (106). La interacción del receptor de NK DNAM1 con algunos antígenos linfoides T como el CD155 y CD161 y de NKG2D con H60 produce lisis de células T activadas (107,108). Otros mecanismos de regulación ejercidos por las células NK son el control de la proliferación CD8+ por competición por la IL15 y la lisis de las células dendríticas implicadas en el desarrollo de EICR (109,110).

3.2.5. Las células NK en el trasplante haploidéntico.

La subpoblación NK es la primera en recuperarse después de un Alo-TPH. En el contexto del trasplante haploidéntico manipulado con procedimientos de selección, Nguyen y cols. publican en 2005 (111) un estudio en 10 pacientes en el que se objetiva una reconstitución NK precoz con predominio de las células CD56^{bright} de fenotipo inmaduro, con baja expresión de KIR inhibidores y de NKp30 y alta expresión de CD94/NKG2A. Estas células mostraron escasa citotoxicidad frente a una línea celular in vitro, por lo que los autores postulan que las células CD56^{bright} de fenotipo inmaduro y de perfil más regulador que citotóxico son responsables de una hiporespuesta inmune que justifica la alta incidencia de recaída precoz en este grupo (recayeron 7 de los 10 pacientes).

En contraposición a esto, el grupo chino de Chang y cols. (83) en el contexto del trasplante haploidéntico no manipulado según protocolo GIAC, encuentra una relación positiva entre la cantidad absoluta de células NK CD56^{bright} en el día 14 del trasplante y una mejor supervivencia global, y demuestran in vitro la capacidad citotóxica de estas células. También describen que en los primeros meses la reconstitución inmune NK postrasplante haploidéntico no manipulado está en su mayoría constituida por células CD56^{bright} inmaduras. Los recuentos totales de NK alcanzan la normalidad en el día +60, mientras las células NK CD56^{bright} ya son normales en el día+14, y se mantienen por encima de la normalidad hasta el día +120. Las células NK CD56^{dim}, sin embargo, no alcanzan niveles normales hasta el día +180. La capacidad citotóxica en el grupo de trasplante haploidéntico, a pesar de la predominancia de células NK CD56^{bright}, es similar a un grupo control de donantes sanos en el día +30. La presencia de EICR retrasa la reconstitución NK en los pacientes.

No se han encontrado publicaciones sobre la reconstitución NK en el seno del trasplante haploidéntico no manipulado con el protocolo de Baltimore (Johns Hopkins).

3.3. Comentario final

El trasplante haploidéntico no manipulado abre una nueva era en la historia del trasplante alogénico al facilitar un posible donante a la práctica totalidad de los pacientes que lo precisan. Adicionalmente la estrategia de profilaxis de la EICR con ciclofosfamida postrasplante hace posible que este tipo de trasplante se haga sin manipulación del injerto con aceptables tasas de EICR y rechazo. Las principales limitaciones clínicas del procedimiento son las tasas de recaída y la alta incidencia de algunas complicaciones como las reactivaciones de CMV o cistitis hemorrágicas por virus BK. Las escasas publicaciones sobre la reconstitución inmune en estos pacientes apuntan hacia ciertas peculiaridades como una reconstitución T algo retrasada o una reconstitución NK diferente al trasplante de donante HLA idéntico convencional, y que probablemente tengan influencia sobre la evolución clínica de los pacientes. La actividad creciente del TPH haploidéntico no manipulado en nuestra institución ha hecho posible la realización de este estudio para caracterizar más detalladamente la reconstitución inmune de estos pacientes y sus posibles implicaciones clínicas y pronósticas. El presente trabajo analiza la reconstitución inmune postrasplante en un modelo de trasplante haploidéntico no manipulado similar al de Baltimore, pero modificado respecto al original en dos puntos principales, con un acondicionamiento basado en busulfan y no en radioterapia y con la sangre periférica como principal fuente de progenitores en vez de la médula ósea.

Hipótesis y Objetivos

4. Hipótesis y Objetivos

4.1. Hipótesis

La hipótesis general del presente proyecto es:

La reconstitución inmunológica de los pacientes tras la realización de un trasplante haploidéntico de sangre periférica no manipulada con estrategia de profilaxis para EICR basada en la ciclofosfamida postrasplante es apropiada y suficiente para permitir una evolución clínica favorable de los pacientes (respecto a la tasa de infecciones, de EICR y de recaída), aunque presenta diferencias sobre todo en los momentos iniciales postrasplante respecto a la de los pacientes sometidos a trasplante alogénico familiar HLA idéntico con estrategias de profilaxis de EICR convencionales.

4.2. Objetivos

OBJETIVOS PRINCIPALES

1. Evaluar la reconstitución inmunológica de los pacientes sometidos a trasplante haploidéntico no manipulado con profilaxis de EICR con ciclofosfamida postrasplante mediante el estudio de las subpoblaciones linfocitarias más relevantes y los niveles de inmunoglobulinas séricas en el primer año postrasplante.
2. Comparar la reconstitución inmune de estos pacientes con un grupo control de trasplante alogénico familiar HLA idéntico con estrategias de profilaxis de EICR convencionales.
3. Buscar interrelaciones entre la reconstitución inmune de los pacientes sometidos a trasplante haploidéntico no manipulado y los resultados clínicos del trasplante.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Comparar la reconstitución inmune T entre ambos grupos en los puntos + 30 días, +90 días, +180 días y +360 días postrasplante, en términos de cuantificación y cinética de las poblaciones linfoides T:
 - Linfocitos T totales.
 - Linfocitos T CD4+ o colaboradores.
 - Linfocitos T CD8+ o citotóxicos.
 - Linfocitos T naïve CD4+ y CD8+.
 - Linfocitos T de memoria CD4+ y CD8+.
 - Linfocitos T de origen tímico temprano CD4+ y CD8+, para mejor valoración de la funcionalidad tímica.
 - Linfocitos T citotóxicos diferenciados CD3+CD8+CD57+, con expresión de CD28+ (perfil citotóxico aloreactivo) y sin expresión de CD28-(perfil regulador o supresor).
 - Linfocitos T activados CD4+ y CD8+.
 - Linfocitos T reguladores CD4+CD25+CD127+débil/negativo.
2. Comparar la reconstitución inmune B entre ambos grupos en los puntos + 30 días, +90 días, +180 días y +360 días postrasplante, en términos de cuantificación y cinética de las poblaciones linfoides B:
 - Linfocitos B totales CD19+
 - Linfocitos B naïve
 - Linfocitos B de memoria.
3. Comparar la reconstitución humoral mediante la cuantificación de inmunoglobulinas séricas entre ambos grupos en los puntos +90 días, +180 días, y +360 días postrasplante.
4. Comparar la reconstitución NK entre ambos grupos en términos de cuantificación y cinética de células NK totales, de las subpoblaciones CD56^{bright} NKG2A+

(inmaduras y reguladoras) y CD56^{dim} (maduras y citotóxicas) en los puntos + 15 días, +30 días, +60 días, +90 días postrasplante.

5. Comparar la expresión de receptores activadores e inhibidores no KIR en las células NK entre ambos grupos en los puntos + 15 días, +30 días, +60 días, +90 días postrasplante.
6. Estudiar si existe correlación dentro del grupo de trasplante haploidéntico entre la reconstitución inmune T precoz y la EICR aguda.
7. Estudiar si existe correlación dentro del grupo de trasplante haploidéntico entre la reconstitución inmune T precoz y la reactivación de citomegalovirus.
8. Estudiar dentro del grupo de trasplante haploidéntico si existe correlación entre la reconstitución inmune T precoz y la supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad, mortalidad infecciosa y recaída.

Pacientes, Material y Métodos

5. Pacientes, Material y Métodos

5.1. Diseño del estudio

El estudio se diseñó como un estudio prospectivo observacional con grupo control, realizado en un único centro.

Se informó y solicitó entrar en el estudio de forma consecutiva a aquellos pacientes sometidos a trasplante haploidéntico no manipulado (grupo de estudio) y a los pacientes sometidos a trasplante familiar HLA idéntico (grupo control) a partir de Noviembre de 2012 en la Unidad de Trasplante de Médula Ósea del Hospital Gregorio Marañón de Madrid.

Los pacientes que aceptaron fueron reclutados tras la firma del consentimiento informado.

Tras la inclusión en el estudio, en ambos grupos se obtuvieron muestras de sangre periférica de los pacientes para la evaluación de la reconstitución inmunológica en los días +15, +30, +60, +90, +180 y +360 postrasplante para el estudio de subpoblaciones linfocitarias por citometría de flujo y cuantificación sérica de inmunoglobulinas.

Las indicaciones de trasplante, tipo de acondicionamiento, profilaxis de la EICR, así como el manejo clínico global de los pacientes se realizó de acuerdo a los criterios y protocolos asistenciales habituales del centro, registrándose las variables clínicas y analíticas necesarias para el estudio durante su seguimiento.

5.2. Selección de pacientes.

Los criterios de selección de los pacientes fueron los siguientes:

A. Grupo de estudio.

- Pacientes consecutivos sometidos a un trasplante haploidéntico no manipulado con profilaxis de EICR basada en ciclofosfamida postrasplante en la Unidad de Trasplante del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid en el periodo evaluado.
- La fuente de progenitores utilizada fue sangre periférica movilizada con G-CSF de acuerdo al protocolo asistencial del centro.
- El acondicionamiento pretrasplante fué mieloablatoivo o no mieloablatoivo según los criterios especificados más adelante.
- Aceptación y firma del consentimiento informado tras información del paciente

B. Grupo control.

- Pacientes consecutivos sometidos a un trasplante alogénico familiar HLA idéntico familiar con profilaxis de EICR convencional en la Unidad de Trasplante del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid en el periodo evaluado.
- La fuente de progenitores fue sangre periférica movilizada con G-CSF de acuerdo al protocolo asistencial del centro.
- El acondicionamiento pretrasplante fue mieloablatoivo o no mieloablatoivo según los criterios especificados más adelante.
- Aceptación y firma del consentimiento informado tras información del paciente

El estudio se inició para el reclutamiento de pacientes en Noviembre de 2012 y se cerró en septiembre del 2014. A fecha 30 de enero de 2015 se cerró la recogida de datos para permitir el análisis de los mismos para el presente trabajo.

De los 33 sujetos que fueron incluidos inicialmente en el grupo de estudio, 3 de ellos finalmente no se analizaron por no disponerse de un número mínimo de muestras bien por fallecimiento precoz (1) o fallos en la recogida y/o procesamiento de las muestras

(2). El reclutamiento en el grupo control fue peor, de forma que de los 17 pacientes a los que se les realizó un trasplante familiar HLA idéntico en el centro en ese periodo solo se consiguió reclutar para el estudio a 10, 2 de los cuales no se pudieron incluir en el análisis por fallecimiento precoz (1), ausencia de muestras (1).

5.3. Protocolos de trasplante y profilaxis de Enfermedad Injerto contra Receptor en grupo de estudio y grupo control

El grupo de estudio (trasplante haploidéntico), siguió un protocolo de acondicionamiento basado en fludarabina y busulfan intravenoso (figuras 10 y 11).

Dependiendo de la enfermedad de base y el estado de la misma previo al trasplante el acondicionamiento fue ablativo (3 o 4 dosis de busulfan intravenoso; figura 10) o bien no mieloablativo (1 o 2 dosis de busulfán intravenoso; figura 11).

La profilaxis de EICR en este grupo incluyó ciclofosfamida intravenosa a dosis de 50 mg/kg/día x2 días (+3 y +4), Mofetil Micofenolato 10 mg/kg/8h intravenoso desde el día +5 hasta tolerancia oral y posteriormente 10 mg/kg/8h VO hasta +35, y ciclosporina 1.5 mg/kg/12h intravenosa desde día -1 hasta tolerancia oral, y posteriormente oral ajustando dosis a niveles en sangre de 175-225 ng/mL según los protocolos habituales del centro. Desde el día +60, en caso de quimerismo mixto, se inició la reducción de la dosis de ciclosporina; en caso de quimerismo completo, se mantuvo la dosis a niveles terapéuticos hasta el día +90. Desde el día +90, y en ausencia de EICR, se inició reducción progresiva semanal de la dosis, hasta suspenderla a los 6 meses post-TPH aproximadamente.

Fig. 10. Protocolo de acondicionamiento mieloablativo del trasplante haploidéntico no manipulado.

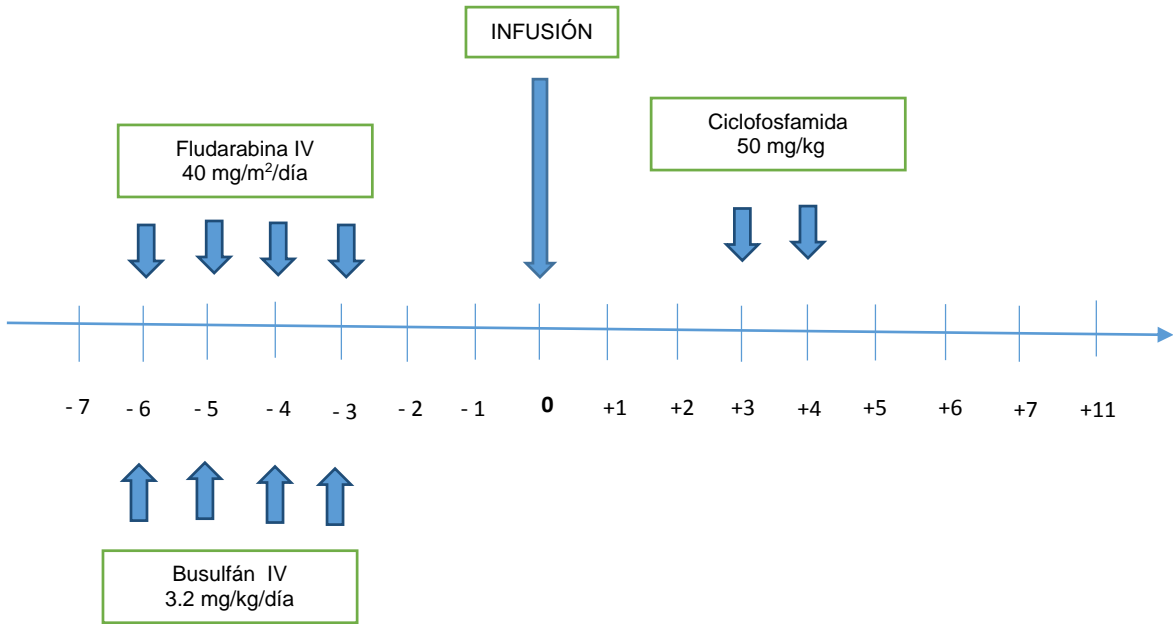
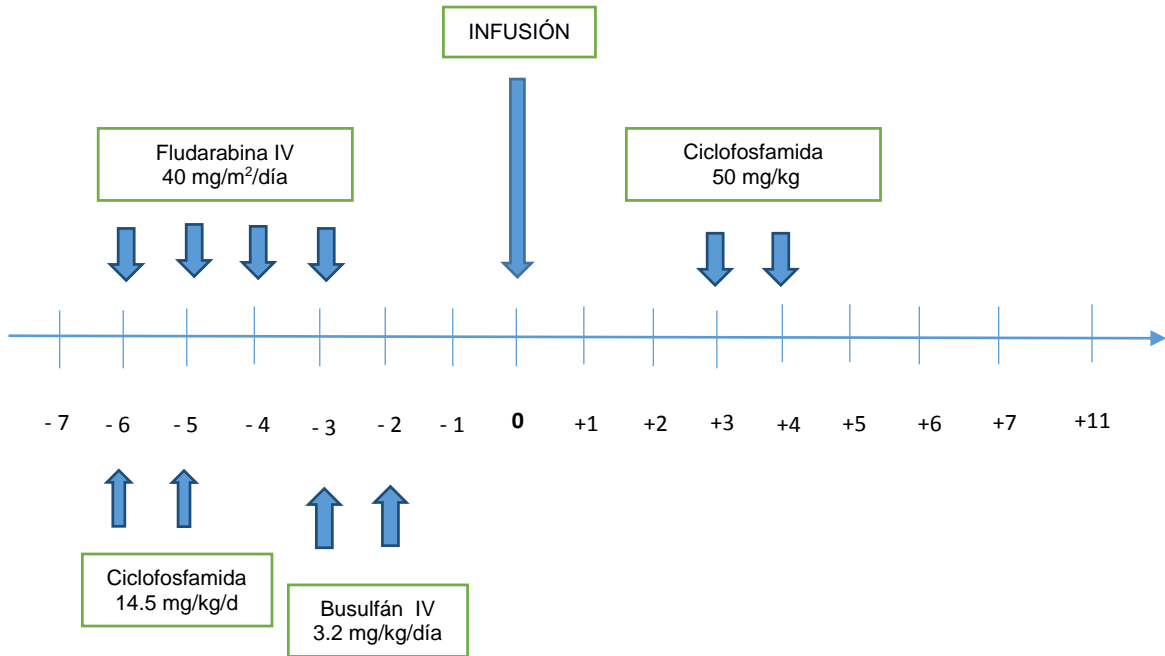


Figura 11. Protocolo de acondicionamiento no mieloablativo del trasplante haploidéntico no manipulado.



El grupo control (trasplante alogénico familiar HLA idéntico) recibió un protocolo de acondicionamiento basado en combinaciones de las siguientes drogas: fludarabina, busulfán intravenoso y melfalan. Al igual que en el grupo anterior de acuerdo con la enfermedad de base y el estado de la misma previo al trasplante el acondicionamiento fue ablativo o no mieloablativo. Los pacientes con indicación de acondicionamiento mieloablativo recibieron esquema Bux-Flu mieloablativo (figura 12). Aquellos en que se indicó un acondicionamiento no mieloablativo recibieron esquema Bux-Flu no mieloablativo (figura 13) si sufrían una patología mieloide y Flu-Mel no mieloablativo (figura 14) si su patología era linfóide o mieloma múltiple. Como profilaxis de EICR se emplearon ciclosporina y metotrexate: ciclosporina 1.5 mg/kg/12h intravenosa desde día -1 hasta tolerancia oral, y posteriormente oral ajustando dosis a niveles en sangre de 175-225 ng/mL, hasta día +50. Desde el día +50 y en ausencia de EICR se redujo la dosis a razón del 5% semanal hasta suspender. La dosis de metotrexate fue de 15 mg/m² en el día +1 y 10 mg/m² en los días +3, +6, +11.

Figura 12. Protocolo de acondicionamiento Bux-Flu mieloablativo

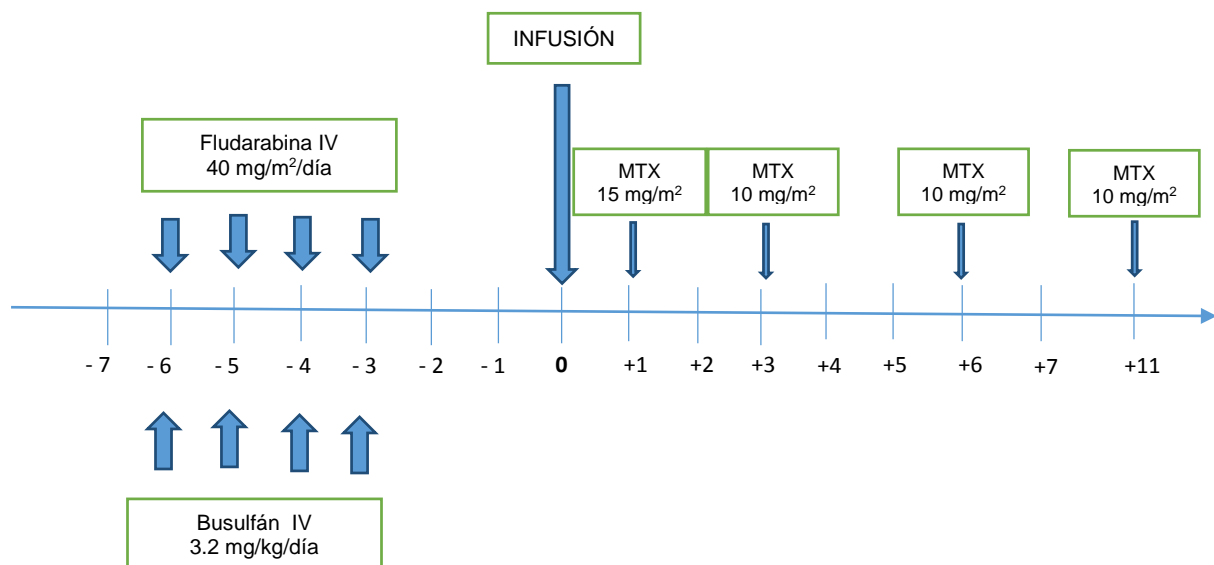


Figura 13. Acondicionamiento Bux –Flu no mieloablativo.

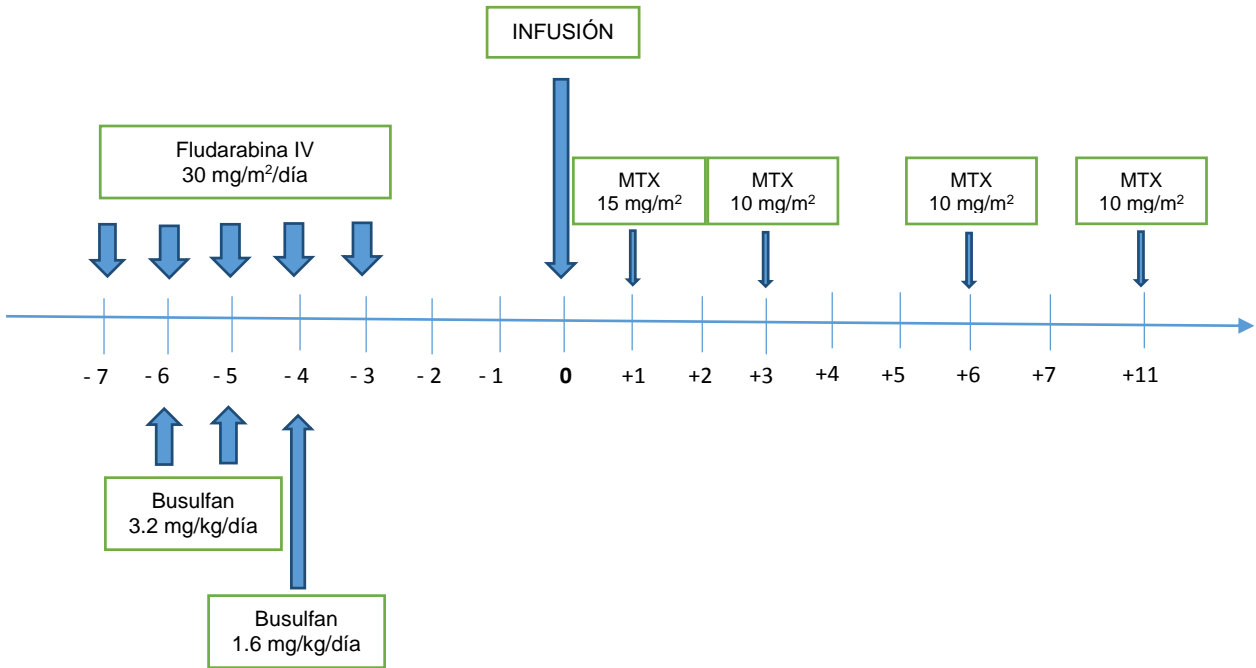
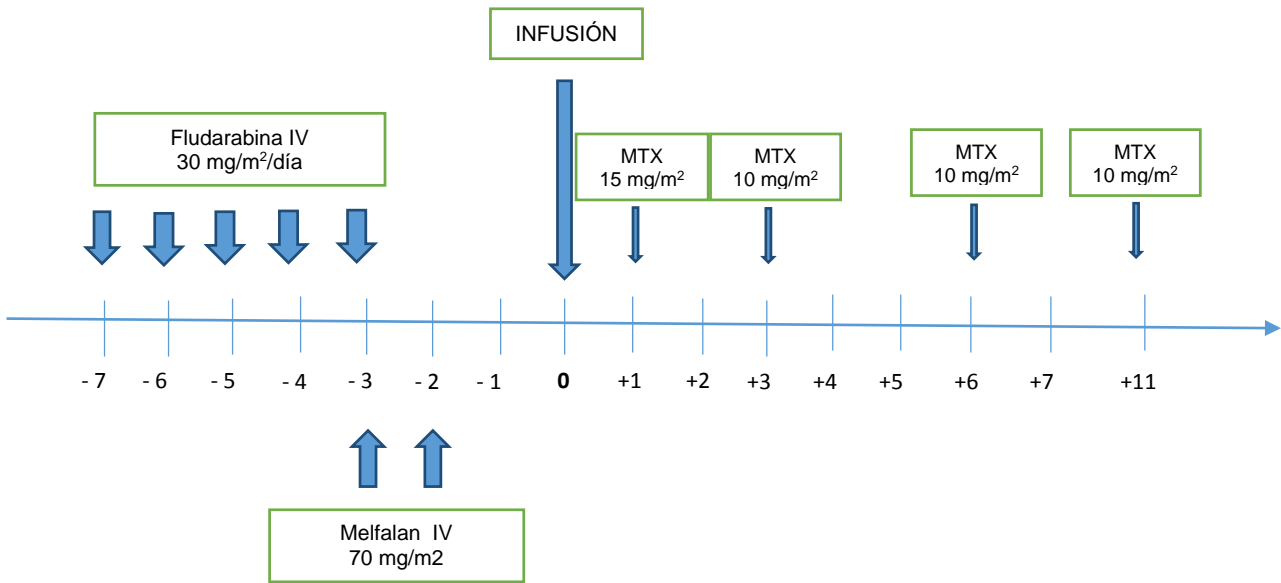


Figura 14. Protocolo de acondicionamiento Flu-Mel no mieloablativo.



5.4. Variables clínicas

5.4.1. Variables registradas en el momento de inclusión

En ambos grupos, al momento de la inclusión de los pacientes se registraron las siguientes variables:

Sexo y edad

Diagnóstico de base que indica el trasplante

Tipo de trasplante/acondicionamiento

Estado de la enfermedad al trasplante

Parentesco del donante

Identidad HLA con el donante

Fecha de trasplante

Células CD34+ totales infundidas

Tipo de acondicionamiento y fármacos empleados

Profilaxis de EICR recibida

5.4.2. Variables de seguimiento.

Las variables registradas durante el seguimiento clínico de los pacientes fueron:

Día de prebendimiento de neutrófilos $> 500/\mu\text{L}$

Día de prebendimiento de neutrófilos $> 1000/\mu\text{L}$

Día de prebendimiento de plaquetas $> 20000/\mu\text{L}$

Día de prebendimiento de plaquetas $> 50000/\mu\text{L}$

Día de quimerismo mayor del 95% del donante

Reactivación de CMV, medida mediante técnicas de antigenemia en células polimorfonucleares o bien de PCR específica para la determinación de la carga viral directa.

Otras infecciones virales

Complicaciones infecciosas bacterianas

Complicaciones infecciosas fúngicas

Enfermedad Injerto Contra Receptor aguda. Grado clínico. Se definió el grado clínico según el GVHD Grading Consensus Conference, Przepiorka et al, 1995 (18).

Enfermedad Injerto Contra Receptor crónica. Diagnóstico según criterios del Nacional Institute of Health, 2005 (14).

Estado (vivo/muerto) al final del seguimiento

Estado de la enfermedad al final del seguimiento.

Fecha de recaída si la hubiera

Fecha de muerte si la hubiera

Causa de muerte

Fecha fin de seguimiento

5.5. Procesamiento y análisis de las muestras. Variables analíticas.

Se obtuvieron muestras de sangre periférica a todos los sujetos del estudio (grupo de estudio y grupo control) en los puntos +15, +30, +60, +90, +180 y +360 días postrasplante.

5.5.1. Estudios de citometría de flujo.

El análisis de subpoblaciones linfocitarias se realizó mediante citometría de flujo multiparamétrica de 5 colores con tecnología Beckman®Coulter en citómetros FC500® y Navios®. Las muestras se distribuyeron aleatoriamente en ambos citómetros según la rutina habitual del laboratorio.

El laboratorio El citómetro FC500 dispone de 5 detectores y puede analizar 5 colores de forma simultánea FITC, PE, ECD, PC5 o APC y PC7, con una configuración de un solo láser de 488 nm o dos láseres de 488nm/633nm. Dispone de tecnología ADC para la compensación automática de las fluorescencias, sistema Digital Signal Processing (DSP) para garantizar la linealidad, y trabaja con un software avanzado CXP.

El citómetro Navios utilizado para el estudio trabaja en una configuración de 2 láseres con 8 detectores de fluorescencia, de forma que permite el análisis de hasta 8 colores simultáneos. Como innovaciones aporta un detector innovador para el “Forward scatter” o luz frontal que permite 3 medidas integradas del tamaño celular y la visualización de partículas de hasta 0.404 μm . Alcanza una la adquisición de 25000 eventos por segundo, con el software avanzado de adquisición Navios Tetra.

En ambos citómetros se utilizaron en este análisis los fluorocromos FITC (Isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), ECD (ficoeritrina-Texas red), PC5 (ficoeritrina-cianina 5) y PC7 (ficoeritrina-cianina 7).

Para el marcaje linfocitario se utilizaron anticuerpos monoclonales conjugados de marca registrada Beckman®Coulter en que estos fluorocromos se combinaron con los siguientes anticuerpos: CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, CD57, CD27, CD28, HLA-DR, CD38, CD45, CD45Ra, CD45Ro, CD 62L,IgD, CD25, CD127, NKP30, NKP46, NKG2D, NKP44, NKG2A.

Los paneles con las combinaciones de marcadores y los tubos de análisis utilizados en cada momento de muestreo se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 5. Paneles de combinaciones de anticuerpos monoclonales utilizados para el estudio en los diferentes puntos

+15 +60	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5
TUBO	FITC	PE	ECD	PC5	PC7
1	CD8	CD4	CD3	CD19	CD45
2	CD3	CD336	CD56	CD335	CD45
3	CD3	CD314	CD56	CD337	CD159a

+30 +90	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5
TUBO	FITC	PE	ECD	PC5	PC7
1	CD8	CD45RO	CD3	CD4	CD45
2	CD8	CD14	CD19	CD25	CD45
3	CD3	CD336	CD56	CD335	CD45
4	CD3	CD314	CD56	CD337	CD159a
5	CD3	CD127	CD4	CD25	CD45
6	CD45RA	CD31	CD8	CD4	CD45
7	CD45RA	CD27	CD8	CD4	CD45
8	HLA-DR	CD38	CD8	CD4	CD45
9	CD57	CD28	CD8	CD3	CD45
10	IgD	CD27	CD19	CD38	CD45

+180 +360	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5
TUBO	FITC	PE	ECD	PC5	PC7
1	CD8	CD4	CD3	CD56	CD45
2	CD8	CD14	CD19	CD25	CD45
3	CD8	CD45RO	CD3	CD4	CD45
4	CD3	CD127	CD4	CD25	CD45
5	CD45RA	CD31	CD8	CD4	CD45
6	CD45RA	CD27	CD8	CD4	CD45
7	HLA-DR	CD38	CD8	CD4	CD45
8	CD57	CD28	CD8	CD3	CD45
9	IgD	CD27	CD19	CD38	CD45

Mediante esta tecnología se evaluó la reconstitución inmune T, B y NK mediante las siguientes determinaciones:

- ✓ La reconstitución inmune T se evaluó en los puntos +30, +90, +180 y +360 días mediante la cuantificación en células por microlitro en sangre periférica de las siguientes subpoblaciones:
 - Linfocitos T totales (CD3+)
 - Linfocitos T CD4+ o colaboradores (CD3+CD4+)
 - Linfocitos T CD8+ o citotóxicos (CD3+CD8+).
 - Linfocitos T Naïve CD4+ (CD3+CD4+CD45Ra high CD62L+ o CD27+).
 - Linfocitos T Naïve CD8+(CD3+CD8+CD45Ra high CD62L+ o CD27+).
 - Linfocitos T de memoria CD4+(CD3+CD4+CD45Ro+)
 - Linfocitos T de memoria CD8+(CD3+CD8+CD45Ro+)

- Linfocitos T de origen tímico temprano CD4+(CD3+CD4+CD45Ra highCD31+)
 - Linfocitos T de origen tímico temprano CD8+(CD3+CD8+CD45Ra highCD31+)
 - Linfocitos T citotóxicos diferenciados CD3+CD8+CD57+, con expresión de CD28+ (perfil citotóxico aloreactivo) y sin expresión de CD28-(perfil regulador o supresor).
 - Linfocitos T activados CD4+ (CD3+CD4+CD38+HLADR+)
 - Linfocitos T activados CD8+ (CD3+CD8+CD38+HLADR+)
 - Linfocitos T reguladores CD4+CD25+CD127+débil/negativo
- ✓ La reconstitución inmune de linfocitos B se analizó en los puntos +30, +90, +180, +360 días mediante la cuantificación en células por microlitro en sangre periférica de las siguientes subpoblaciones:
- Linfocitos B totales CD19+
 - Linfocitos B naïve (CD19+ IgD + CD27-).
 - Linfocitos B de memoria (CD19+ IgD + CD27+).
- ✓ La reconstitución inmune NK se analizó en los días +15, +30, +60 y +90 mediante:
- Cuantificación en células por microlitro en sangre periférica de las células NK circulantes, totales (CD3-CD56+) y de sus subpoblaciones con expresión CD3-CD56+débil (CD56^{dim}), más maduras y CD3-CD56+intenso (CD56^{bright}), más inmaduras.
 - Determinación de la expresión en las células NK de receptores activadores e inhibidores no KIR: NKP30, NKP46, NKG2D, NKG2A.
- ✓ Para determinar si la reconstitución inmune precoz del grupo de estudio influía en la supervivencia global, libre de enfermedad y mortalidad infecciosa, se registraron también las siguientes variables analíticas:

- Recuento linfocitario total por microlitro a los 30 días (ALC30)
- Linfocitos T CD3+ por microlitro en el día +30
- Linfocitos T CD4+ o colaboradores por microlitro en el día +30
- Linfocitos T CD4+ o colaboradores por microlitro a los 3 meses (día +90)
- Porcentaje y recuentos totales por microlitro de células CD56^{bright} a los 15 y 30 días.

5.5.2. Estudios séricos

En el laboratorio de inmunología se llevó a cabo la cuantificación de inmunoglobulinas, mediante nefelometría, con tecnología Beckman®Coulter.

Mediante esta tecnología se evaluó la reconstitución humoral en los días +90, +180, y +360 por medio de:

- Cuantificación de inmunoglobulinas IgA, IgM, IgG en mg/dL.

5.6. Análisis estadístico

El análisis descriptivo tanto de las características de los pacientes de ambos grupos como de la reconstitución inmune del grupo de estudio, se realizará mediante la elaboración de frecuencias para las variables cualitativas y medianas acompañadas de medias de dispersión (percentil 25 y 75 en la mayoría de los casos o bien máximo y mínimo en aquellas variables con poca dispersión) para las variables cuantitativas.

Posteriormente se compararán las características demográficas del grupo de estudio (trasplante haploidéntico no manipulado) y grupo control (trasplante HLA idéntico familiar) para detectar posibles diferencias relevantes y se procederá a la comparación estadística de las principales subpoblaciones linfocitarias y de otros aspectos de la reconstitución inmune entre ambas poblaciones.

Dado que la mayoría de las variables no se ajustaban a una distribución normal, para la comparación entre ambos grupos se utilizaron en general test estadísticos no paramétricos. Las variables cualitativas se compararon mediante tablas de contingencia valorando la aparición de diferencias según el test de Chi cuadrado (X^2) de Pearson o la prueba exacta de Fisher. Para contrastar diferencias entre variables de tipo cuantitativo continuo se empleó el test de U-Mann-Whitney.

Para el análisis de supervivencia se realizaron curvas ROC para determinar si las variables analizadas presentaban algún punto de corte discriminativo, y posteriormente se realizaron curvas de Kaplan Meyer.

En todos los casos se consideró estadísticamente significativo un valor $p < 0,05$.

El análisis de datos y la elaboración de gráficos estadísticos se realizó de forma automatizada con el programa informático SPSS (versión 21).

Las tablas de datos fueron diseñadas y registradas inicialmente en el programa informático Excell, Microsoft Office.

5.7. Aspectos éticos

El estudio se llevó a cabo siguiendo rigurosamente las recomendaciones éticas internacionales para investigación y ensayos clínicos en humanos recogidas en las declaraciones internacionales éticas de Helsinki y sus revisiones de la Asociación Médica Mundial (Declaración de Helsinki de la AMM-Principios éticos para las investigaciones médicas en seres Humanos-versión revisada de Fortaleza, Brasil, octubre 2013), las recomendaciones de la OMS, el código deontológico, las derivadas de la legislación española sobre ensayos clínicos (Ley 29/2006 de 26 de Julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios, Real Decreto 223/2004, por el que se regulan los ensayos clínicos en humanos), así como las Normas de Buena Práctica Clínica (Guía Tripartita armonizada de Buenas Prácticas Clínicas de

la ICH-International Conference of Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, elaborada por la AEMPS, 1997).

Según lo estipulado en la normativa vigente, el estudio fue presentado y obtuvo aprobación por escrito del Comité Ético en Investigación Clínica que le aplica con fecha 6 de septiembre de 2012. Así mismo, fue presentado en la Agencia Española del medicamento (AEMPS) para su clasificación con fecha 14 de septiembre de 2012.

5.7.1. Consentimiento informado.

Durante el tiempo de reclutamiento, el equipo investigador se aseguró de que el paciente comprendía todos los aspectos que le afectaban respecto a su inclusión en el estudio, las muestras que se iban a obtener, y los posibles beneficios que su participación podría obtener para otros pacientes. También se le informó en todo momento de la posibilidad de abandonar el estudio y del tratamiento que se iba a realizar de sus datos, respondiendo a todas sus dudas y preguntas.

Una vez informado de forma fehaciente se les requirió la firma tras su lectura detallada de un documento de información al paciente y consentimiento informado.

Este documento fue elaborado para explicar el estudio con un lenguaje sencillo y accesible a los pacientes y fue aprobado junto con el protocolo del estudio por el Comité Ético en Investigación Clínica del Centro.

5.7.2. Confidencialidad de los datos

Durante el estudio se garantizó en todo momento que la información obtenida se manejó de forma confidencial, excepto para su inclusión en una publicación, según la ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal. Fuera de publicaciones científicas, la información sólo podría ser divulgada al comité ético de investigación clínica si procediese, a la institución de pertenencia, a las autoridades sanitarias y a los empleados en el marco de un compromiso de confidencialidad adecuado.

Se mantuvo la confidencialidad de la identidad del paciente mediante el uso de códigos de identidad numéricos para el manejo de los datos en las bases de datos de recogida y explotación. Los datos completos de reclutamiento, con la filiación de los pacientes y el consentimiento por escrito fueron custodiados por el equipo investigador de forma en que se garantizase su confidencialidad. De acuerdo con la citada ley, los datos personales que se requieren de los sujetos son los necesarios para cubrir los objetivos del estudio. El sujeto participante tiene derecho al acceso a sus datos personales y a solicitar su rectificación o cancelación ante el investigador principal.

5.7.3. Financiación.

El presente estudio se financió de forma parcial con una beca de investigación de la Fundación Mutua Madrileña, convocatoria 2012.

5.7.4. Política de publicación.

De acuerdo con el RD 223/2004 el equipo investigador se comprometió a la publicación de los resultados del estudio, tanto positivos como negativos.

Resultados

6. Resultados

6.1. Características clínicas. Grupo de trasplante haploidéntico y grupo control.

Se reclutaron para el presente estudio entre noviembre de 2012 y septiembre de 2014 un total de 33 pacientes sometidos a un trasplante haploidéntico no manipulado (grupo de estudio) y 10 pacientes sometidos a un trasplante alogénico familiar HLA idéntico (grupo control). Para el análisis solo se pudieron incluir 30 pacientes en el grupo de estudio y 8 en el grupo control, el resto se excluyeron por no disponer de suficientes muestras.

Las características clínicas de ambos grupos se muestran en la tabla 6. La mediana de edad fue de 39,50 años (RI 29,75-48,75) en el grupo de estudio y 56.5 años (RI 33.25-61.65) en el grupo control. Los diagnósticos de base de los pacientes de ambos grupos fueron leucemia aguda mieloide y linfoide, leucemia mieloide crónica, linfomas Hodgkin y no Hodgkin, síndromes mielodisplásicos, aplasia medular y mieloma múltiple. La fuente de progenitores fue sangre periférica movilizada en todos los casos. De los pacientes, el 60% del grupo de estudio y el 37.5% del grupo control estaba en remisión completa. Dentro del grupo de estudio, 10 de los 30 pacientes habían recibido un trasplante autólogo previo y 2 un trasplante alogénico. 2 de los 8 pacientes del grupo control habían recibido un trasplante autólogo previo. El acondicionamiento fue no mieloablativo en 16/30 pacientes (53.3%) del grupo de estudio y en 5/8 (62.5%) del grupo control, y mieloablativo en 14/30 (46.7%) del grupo de estudio y 3/8 (37.5%) del grupo control.

Se infundieron una mediana de $5,3 \times 10^6$ células progenitoras CD34+ por Kg del receptor en el grupo de estudio y 5.7 (RI 4.8-8.1) en el grupo control. Se alcanzaron recuentos de neutrófilos mayores de 500 células/mm³ en una mediana de 17 días (RI 16-19 días) en el grupo de estudio y 15 días (RI 14.2-16.7) en el grupo control, y de

plaquetas mayores de 20000/mm³ en una mediana de 30 días (RI 28-40 días) y 12 días (RI 10-13) respectivamente. Un 96.6% de los pacientes en el grupo haploidéntico y un 75% en el grupo control alcanzaron un quimerismo estable en sangre periférica con más del 95% del donante en el día +30. En el día +60 todos los pacientes de ambos grupos tenían quimerismo con más del 95% de donante.

Un 46.7% del grupo control y un 50% del grupo de estudio desarrolló EICR aguda clínicamente significativa (Grados II-IV). A fecha del final del seguimiento 6 pacientes del grupo de estudio y 5 del grupo control habían desarrollado EICR crónica.

En cuanto a las complicaciones infecciosas, en el grupo de estudio haploidéntico se observó reactivación del CMV en un 73.3% de los pacientes en los primeros 100 días. En todo el seguimiento se registraron 3 casos de infección fúngica probada (aspergilosis pulmonares) y 7 casos de infección fúngica “probable”. 4 casos tuvieron complicaciones virales no relacionadas con el CMV (neumonía por parainfluenza, bronconeumonía por Influenza A, neuralgia postherpética e infección por Virus Varicella Zoster). Dentro del grupo control de trasplante HLA idéntico familiar se objetivó reactivación CMV en 5/8 pacientes (62.5%) y solo 1 caso de infección fúngica probada (12.5%). No apareció ninguna infección vírica no CMV. La incidencia de cistitis hemorrágica fue de 14/30 pacientes (46.7%) en el grupo de estudio haploidéntico, la mayoría de origen infeccioso, y 2/8 pacientes (25%) en el grupo control.

Hasta el final del seguimiento la supervivencia global fue de 66.6%(20/30 pacientes) en el grupo de estudio haploidéntico y de 62.5%(5/8 pacientes) en el grupo de control, con unas medianas de seguimiento de 10 meses (R 1-26) y 11.5 meses (R 4-22) respectivamente.

La tasa de recaída fue de 16.6% (5/30) en el grupo de estudio haploidéntico y 37.5% (3/8) en el grupo control.

Comparando las características clínicas que podrían influir en la reconstitución inmune entre los grupos de trasplante haploidéntico y del grupo control no se objetivaron diferencias significativas en la edad, sexo, diagnóstico, estado de la enfermedad al trasplante, tipo de acondicionamiento, células CD34+ por infundidas. El grupo haploidéntico tuvo un prendimiento de neutrófilos y plaquetario más largo y menor incidencia de EICR aguda (grados I-IV) y crónica.

Tabla 6. Principales características clínicas de los pacientes del grupo de trasplante haploidéntico y del grupo control de trasplante alogénico familiar idéntico.

		Grupo Haploidéntico (30)	Grupo control(8)	p
Sexo V/M		21/9	4/4	0.4
Edad mediana(RI)		39,5 (29.75-48.75)	56.5 (33.25-61.65)	0.12
Diagnósticos n(%)				0.19
	LMA	9(30%)	3(37.5%)	
	LLA	3(10%)		
	LMC	4(13.3%)		
	LNH	5(16.6%)	3(37.5%)	
	LH	7(23.3%)		
	SMD	1(3.3%)	1(12.5%)	
	Aplasia	1(3.3%)		
	MM		1(12.5%)	
Estado de la enfermedad al TPH n(%)				0.4
	RC	18(60%)	3(37.5%)	
	RP	3(10%)	2(25%)	
	EV/NR	9(30%)	3(37.5%)	
Tipo de acondicionamiento n(%)				0.7
	No mieloablatoivo	16(53.3%)	5(62.5%)	
	Mieloablaivo	14(46.7%)	3(37.5%)	
CD34+ infundidas x10e6/Kg mediana(RI)		5,3 (4,3-6)	5.7 (4.8-8.1)	0.25
Días para neutrófilos >500/mm3 mediana(RI)		17 (16-19 días)	15 (14.25-16.75 días)	0.05
Días para plaquetas >20000/mm3 mediana(RI)		30 (28-40 días)	12 (10-13días)	0.00
EICR aguda n(%)				0.01.
	0	9(30%)	0	
	I	7(23.3%)	4(50%)	
	II	12(40%)	1(12.5%)	
	III-IV	2(6.7%)	3(37.5%)	
EICR crónica n(%)		6(20%)	5(62.5%)	0.03

6.2. Comparación de la reconstitución inmune en ambos grupos.

6.2.1. Poblaciones linfoides T.

El grupo de trasplante haploidéntico tuvo menores recuentos de linfocitos T totales, CD4+ y CD8+ en el día +30 que el grupo control, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,000$).

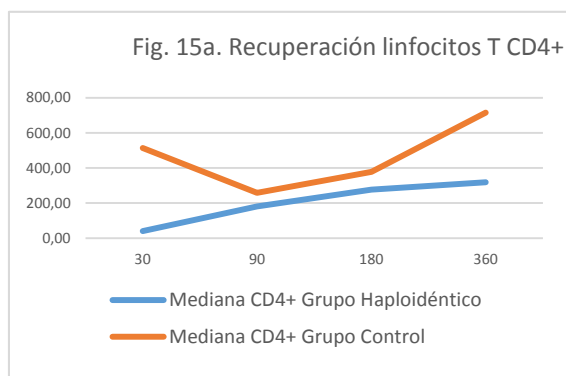
En el día +90, las diferencias significativas solo se mantuvieron en los recuentos de los linfocitos T colaboradores o CD4+ ($p = 0,02$).

Los CD4+ fueron menores en el grupo haploidéntico durante todo el periodo de seguimiento posterior, aunque sin significación estadística en los días +180 y +360. El grupo haploidéntico no obtuvo una mediana mayor de 200 CD4+/ μ L hasta los 6 meses postrasplante, mientras que el grupo control ya la había alcanzado en el primer mes. En el punto de estudio +360 días, los linfocitos T CD4+ alcanzaron los límites de la normalidad ($>400/\mu$ L) en el grupo control. En el grupo haploidéntico, al final del seguimiento, los linfocitos T CD4+ aún se encontraban por debajo del límite inferior de la normalidad.

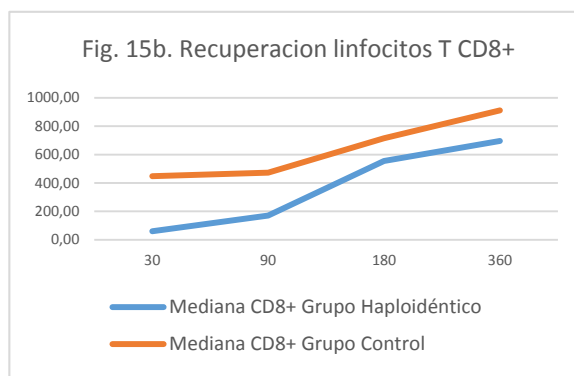
En cuanto a los linfocitos T CD8+ o citotóxicos, no se objetivaron diferencias estadísticas entre ambos grupos en los puntos de estudio +90, +180 y +360 días. Los recuentos de linfocitos T CD8+ se normalizaron ya en el grupo control a los 3 meses (+90). Analizando la cinética de recuperación CD8+ en el grupo haploidéntico, a pesar de que los recuentos son bajos en el día +30 a partir de los 3 meses (+90) esta población sufre una recuperación explosiva compensadora de modo que a los 6 meses postrasplante (+180) se habían alcanzado recuentos normales (Tabla 7)

Tabla 7. Recuentos linfoides T en grupo haploidéntico y grupo control. Expresados en células por microlitro, mediana y percentiles 25 y 75.

Día	Subp.	Grupo Haploidéntico				Grupo Control				p
		N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
30	CD8	30	60,00	30,25	122,00	8	448,50	179,00	589,50	0,000
	CD4	30	40,00	17,00	73,65	8	514,00	327,00	732,00	0,000
	CD3	30	110,00	66,50	223,00	8	903,00	392,50	1153,75	0,000
90	CD8	27	170,00	78,00	906,00	8	473,50	335,50	652,25	0,323
	CD4	27	181,00	91,00	212,00	8	258,00	205,50	332,25	0,024
	CD3	27	412,00	203,00	1194,00	8	783,00	657,25	973,00	0,206
180	CD8	21	555,00	246,00	904,50	6	715,50	511,75	1022,00	0,441
	CD4	21	277,00	140,50	320,00	6	378,00	213,50	589,75	0,110
	CD3	21	894,00	465,50	1248,00	6	1131,00	800,75	1591,75	0,263
360	CD8	11	696,00	562,00	1843,00	5	911,00	678,00	1323,50	1,000
	CD4	11	319,00	164,00	499,00	5	715,00	360,00	1222,00	0,052
	CD3	11	1125,00	747,00	2149,00	5	1439,00	1198,00	2670,50	0,180



N	+30	+90	+180	+360
Haplo	30	27	21	11
Control	8	8	6	5



N	+30	+90	+180	+360
Haplo	30	27	21	11
Control	8	8	6	5

Figura 15. Reconstitución de linfocitos T CD4+/μL(15a) y T CD8+/μL (15b) en ambos grupos.

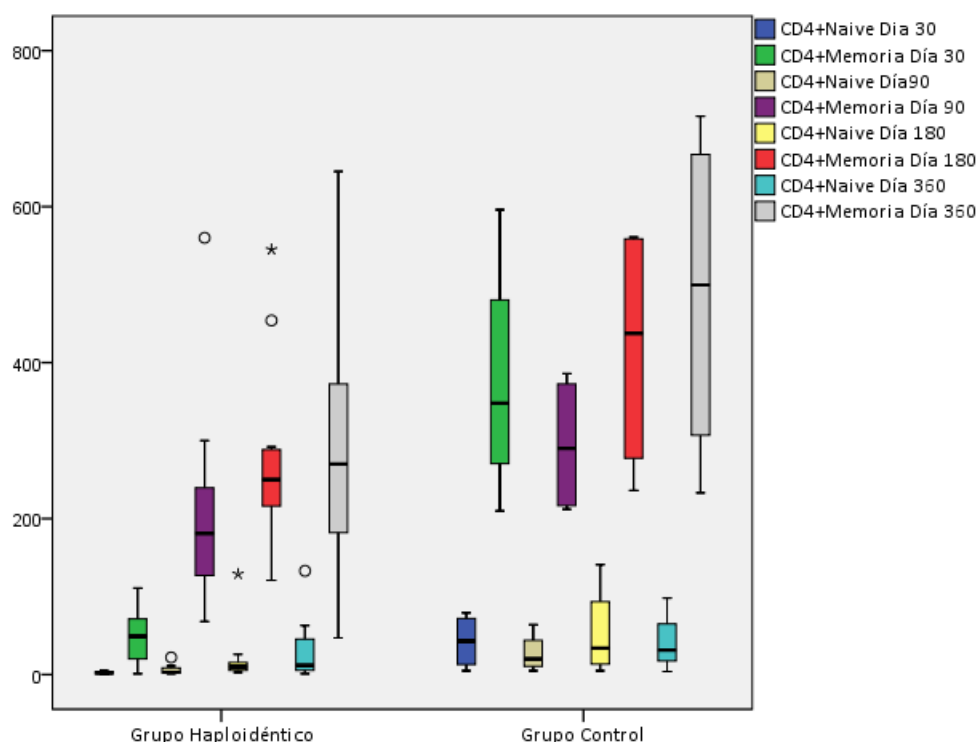
- ✓ Peor reconstitución de Linfocitos T totales , CD4+ y CD8+ en grupo haploidéntico en el primer mes
- ✓ Peor reconstitución Linfocitos T CD4+ durante todo el seguimiento en grupo haploidéntico
- ✓ Reconstitución rápida de linfocitos T CD8+ a partir del día +90 en el grupo haploidéntico

6.2.1.1. Linfocitos T Naïve y de Memoria.

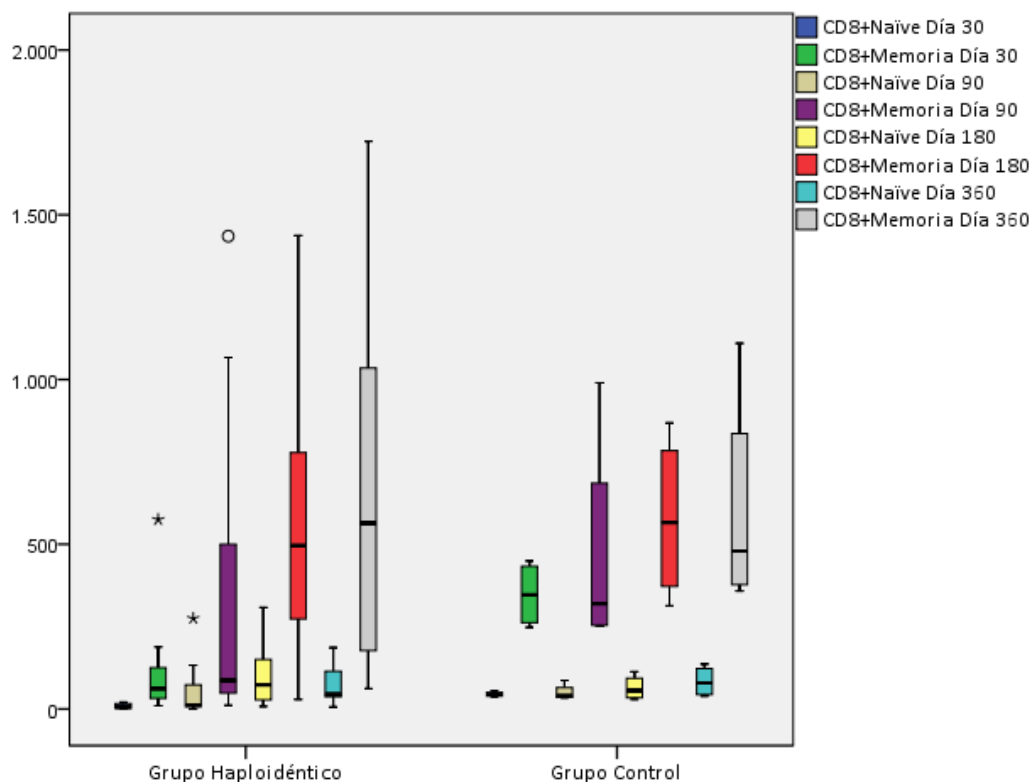
Se analizaron los Linfocitos T CD4+ naïve (CD3+CD4+CD45Ra high CD62L+ o CD27+), y de Memoria (CD3+CD4+CD45Ro+), así como los Linfocitos T CD8+ naïve (CD3+CD8+CD45Ra high CD62L+ o CD27+) y de Memoria (CD3+CD8+CD45Ro+).

En cuanto a la distribución entre linfocitos naïve y de memoria (figura 16), la reconstitución linfoide T en el grupo de trasplante haploideéntico se realizó fundamentalmente a partir de las células linfoides T de memoria, al igual que en el grupo control. Entre el día +90 y +180 aparecen las células de origen naïve en el grupo de trasplante haploideéntico, de forma especialmente significativa para la subpoblación T CD8+.

Figura 16. Comparación entre células T naïve y de Memoria por microlitro en ambos grupos (+30,+90,+180,+360). Fig. 16a. Linfocitos T CD4+ naïve y Memoria en ambos grupos. Fig. 16b. Linfocitos T CD8+ naïve y Memoria en ambos grupos



16a



16b

Al igual que lo observado en las poblaciones T totales el grupo haploidéntico tuvo menores recuentos T CD4+ y CD8+, tanto naïve como memoria en el primer mes que el grupo control (0,000).

A los 3 y 6 meses (+90 y +180 días) aún se detectaban diferencias significativas en el recuento de linfocitos colaboradores CD4+ naïve, que continuaban siendo menores en el grupo haploidéntico (0,000 y 0,01). Al año ya no se encontraba diferencia significativa entre ambos grupos.

Los linfocitos CD4+ de memoria, aunque fueron más similares en ambos grupos, también se mantuvieron en niveles inferiores en el grupo haploidéntico durante todo el seguimiento, solo con diferencias estadísticas significativas en el punto +180 (6 meses) p 0,03.

Los linfocitos T CD8+ naïve y memoria no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos a partir de los 3 meses (+90).

A pesar de ello, los linfocitos T CD8+ naïve eran menores en el grupo haploidéntico en este punto (+90), pero mostraron una adecuada recuperación a partir del día 180, en que ya fueron muy similares a los del grupo control hasta el final del seguimiento.

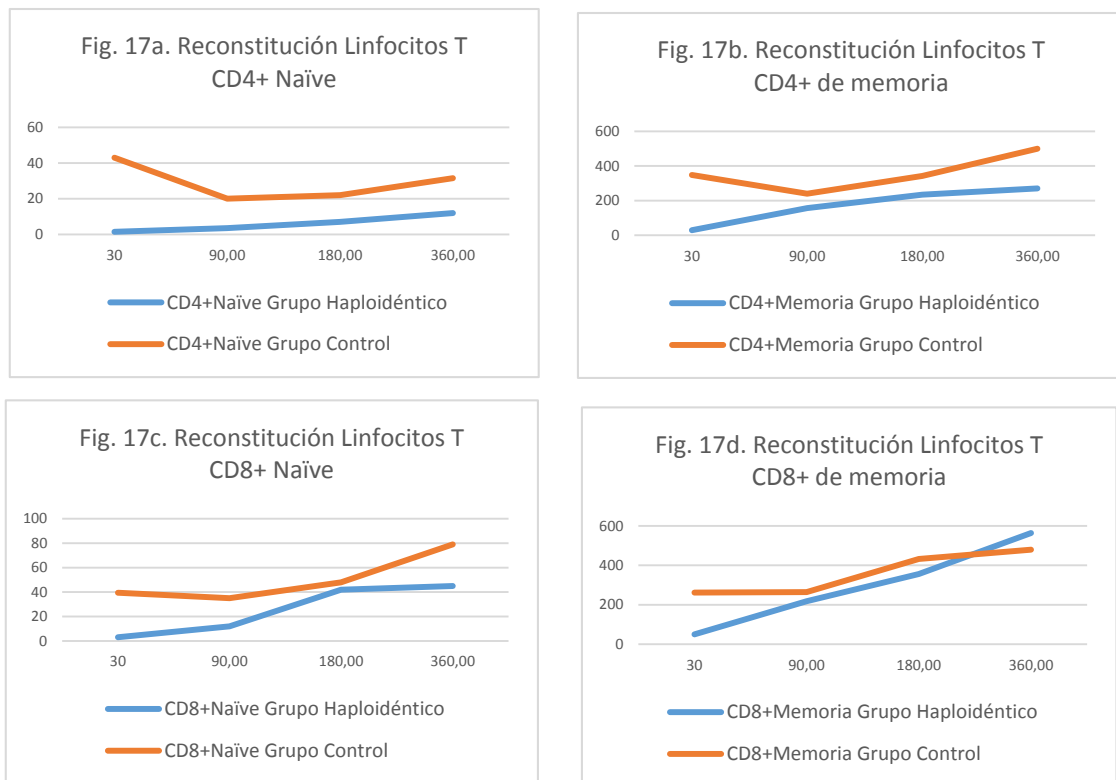
La población CD8+ de memoria en el grupo haploidéntico fue la que tuvo una recuperación más similar al grupo control a partir del día +90 (3 meses).

En la tabla 8 y figura 17 se exponen los recuentos de las células linfoides naïve y memoria en los diferentes puntos del estudio.

Tabla 8. Comparación de las poblaciones linfoides T naïve y de memoria entre ambos grupos expresados en células por microlitro.

Día	Subpoblación	Grupo haploidéntico				Grupo Control				P
		N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
30										
	CD4+Naïve	30	1,50	0,00	4,00	8	43,00	18,25	78,00	0,000
	CD8+Naïve	30	3,00	1,00	6,25	8	39,00	32,00	52,75	0,000
	CD4+Memoria	30	29,00	14,00	63,00	8	348,00	220,75	487,00	0,000
	CD8+Memoria	30	50,00	23,25	113,75	8	262,00	138,75	441,00	0,001
90										
	CD4+Naïve	28	3,50	1,25	7,00	8	20,00	11,50	55,75	0,000
	CD8+Naïve	28	12,00	6,25	41,25	8	35,50	19,50	76,00	0,091
	CD4+Memoria	28	157,00	90,25	239,00	8	240,50	146,00	335,00	0,168
	CD8+Memoria	28	218,50	53,75	582,00	8	264,50	191,75	837,75	0,513
180										
	CD4+Naïve	25	7,00	4,00	12,50	7	22,00	13,00	141,00	0,010
	CD8+Naïve	25	42,00	15,00	89,00	7	48,00	29,00	113,00	0,474
	CD4+Memoria	25	234,00	129,00	286,00	7	343,00	236,00	556,00	0,034
	CD8+Memoria	25	356,00	214,00	752,50	7	432,00	313,00	810,00	0,562
360										
	CD4+Naïve	11	12,00	5,00	54,00	4	31,50	10,75	81,50	0,661
	CD8+Naïve	11	45,00	36,00	137,00	4	79,00	41,50	129,25	0,661
	CD4+Memoria	11	270,00	139,00	435,00	4	499,50	270,00	691,50	0,138
	CD8+Memoria	11	564,00	105,00	1059,00	4	479,50	367,75	973,00	1,000

- ✓ Reconstitución predominante a partir de linfocitos de memoria en ambos grupos
- ✓ En el grupo haploidéntico aparición de las células naïve entre los 90 y 180 días postrasplante, sobre todo de la subpoblación CD8+



N	+30	+90	+180	+360
Haplo	30	28	25	11
Control	8	8	7	4

Figura 17. Reconstitución de las poblaciones T naïve y de memoria en ambos grupos.

6.2.1.2. Linfocitos de origen tímico

Se analizaron los linfocitos T CD4+ y CD8+ de origen tímico temprano CD3+CD4+CD45Ra high CD31+ y CD3+CD8+CD45Ra high CD31+.

Los linfocitos T de origen tímico CD4+ y CD8+ en el primer mes (+30) fueron significativamente menores en el grupo haploidéntico ($p < 0,00$) que en el grupo control. A partir de ese momento, los linfocitos T CD8+ de origen tímico comenzaron a reconstituir en los pacientes del grupo haploidéntico de forma similar al grupo control (día +90). Sin embargo, los linfocitos T CD4+ de origen tímico reconstituyeron más lentamente, y aun fueron menores en el grupo haploidéntico en los puntos +90 ($p < 0,002$), y +180 ($p < 0,034$). A partir de este punto la reconstitución fue rápida alcanzando niveles similares al grupo control en el día +360 (Tabla 9 y figura 18).

Tabla 9. Comparación de la reconstitución de los linfocitos de origen tímico entre ambos grupos expresados en células por microlitro.

Día	Subpoblación	Grupo Haploidéntico				Grupo Control				p
		N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
30	CD4+ Tímicas	30	2,00	0,00	4,00	8	29,50	10,25	49,75	0,000
	CD8+ Tímicas	30	4,50	2,00	8,00	8	114,00	32,75	204,25	0,000
90	CD4+ Tímicas	28	3,00	2,00	6,75	8	13,50	5,50	31,00	0,002
	CD8+ Tímicas	28	28,00	10,00	146,75	8	92,00	39,25	221,25	0,053
180	CD4+ Tímicas	25	7,00	3,00	12,50	7	12,00	8,00	93,00	0,034
	CD8+ Tímicas	25	103,00	50,00	163,00	7	200,00	89,00	277,00	0,261
360	CD4+ Tímicas	11	24,00	3,00	57,00	4	29,00	10,25	56,00	0,489
	CD8+ Tímicas	11	104,00	34,00	228,00	4	246,50	116,25	334,75	0,226

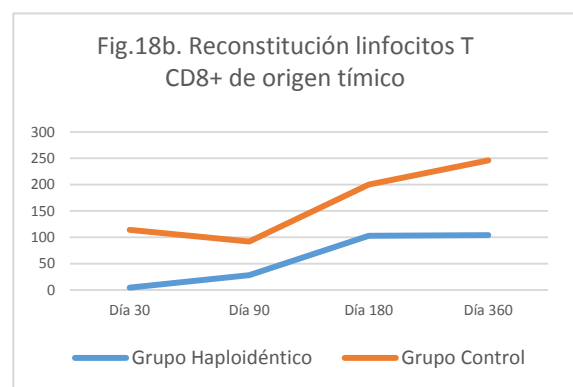
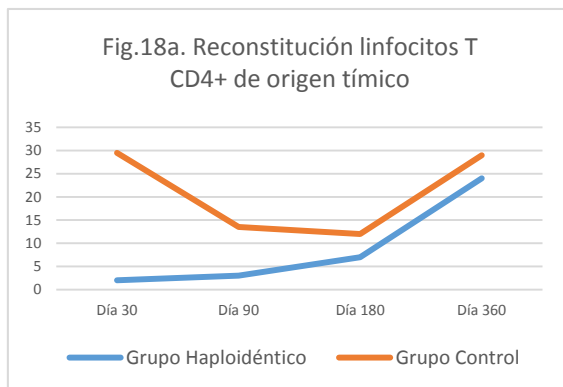


Figura 18. Reconstitución de los linfocitos de origen tímico en ambos grupos

✓ Aparición de los linfocitos de origen tímico temprano en el grupo haploidéntico a partir del día +90-+180 postrasplante, recuperación más precoz de la subpoblación CD8+.

6.2.1.3. Linfocitos CD8+ con expresión de marcadores de citotoxicidad CD57+.

Los linfocitos T citotóxicos diferenciados CD3+CD8+CD57+, al igual que los linfocitos T CD8+ totales, fueron significativamente menores en el primer mes (+30) en el grupo de trasplante haploidéntico (p 0,000). A los 3 meses (día +90) continuaron en niveles

menores que en el grupo control aunque sin diferencias estadísticamente significativas y a partir de este momento se recuperaron rápidamente de forma similar en ambos grupos (tabla 10 y figura 19).

Analizando la expresión de CD28+ en estos linfocitos (marcador de citotoxicidad activa y/o aloreactividad), los recuentos totales por microlitro de linfocitos citotóxicos CD3+CD8+CD57+CD28+ fueron menores en el grupo haploideéntico en los puntos +30 y +90 (p 0,00 y 0,05 respectivamente). A partir de este punto los recuentos aumentaron exponencialmente en el grupo haploideéntico, igualando los recuentos del grupo control en el día +180 y superándolos en el día +360 (tabla10). El porcentaje de linfocitos citotóxicos CD3+CD8+CD57+ que expresaban CD28+ no mostró diferencias significativas en ninguno de los puntos estudiados entre ambos grupos (tabla11).

Los linfocitos T CD3+CD8+CD57+ sin expresión de CD28 (supresores) fueron menores en el grupo haploideéntico en el día +30 de forma paralela al resto de poblaciones CD8+, sin diferencias significativas con el grupo control en el resto de momentos del estudio, +90,+180,+360 (tabla 10).

Tabla 10. Comparación entre las poblaciones de linfocitos T citotóxicos CD3+CD8+CD57+ en grupo haploideéntico y grupo control, expresados en células por microlitro.

Día	Grupo Haploideéntico				Grupo control				p
	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
30									
CD8+57+	30	31,00	11,50	75,50	8	252,00	193,00	328,75	0,000
CD8+57+28+	30	11,00	7,00	29,00	8	92,50	35,25	117,50	0,000
CD8+57+28-	30	15,00	1,00	36,00	8	165,50	104,00	225,00	0,000
90									
CD8+57+	28	136,00	42,00	506,00	8	384,00	126,25	494,50	0,358
CD8+57+28+	28	18,50	8,25	69,25	8	116,50	33,75	163,50	0,059
CD8+57+28-	28	101,00	24,50	420,50	8	241,00	71,25	426,50	0,358
180									
CD8+57+	25	391,00	179,50	686,50	7	489,00	149,00	901,00	0,562
CD8+57+28+	25	57,00	18,50	126,50	7	62,00	47,00	251,00	0,420
CD8+57+28-	25	270,00	131,00	609,50	7	443,00	82,00	636,00	0,656
360									
CD8+57+	11	484,00	137,00	1044,00	4	594,50	272,75	1185,50	0,571
CD8+57+28+	11	79,00	24,00	171,00	3	58,00	47,00	153,00	0,769
CD8+57+28-	11	278,00	87,00	961,00	3	552,00	110,00	1228,00	0,659

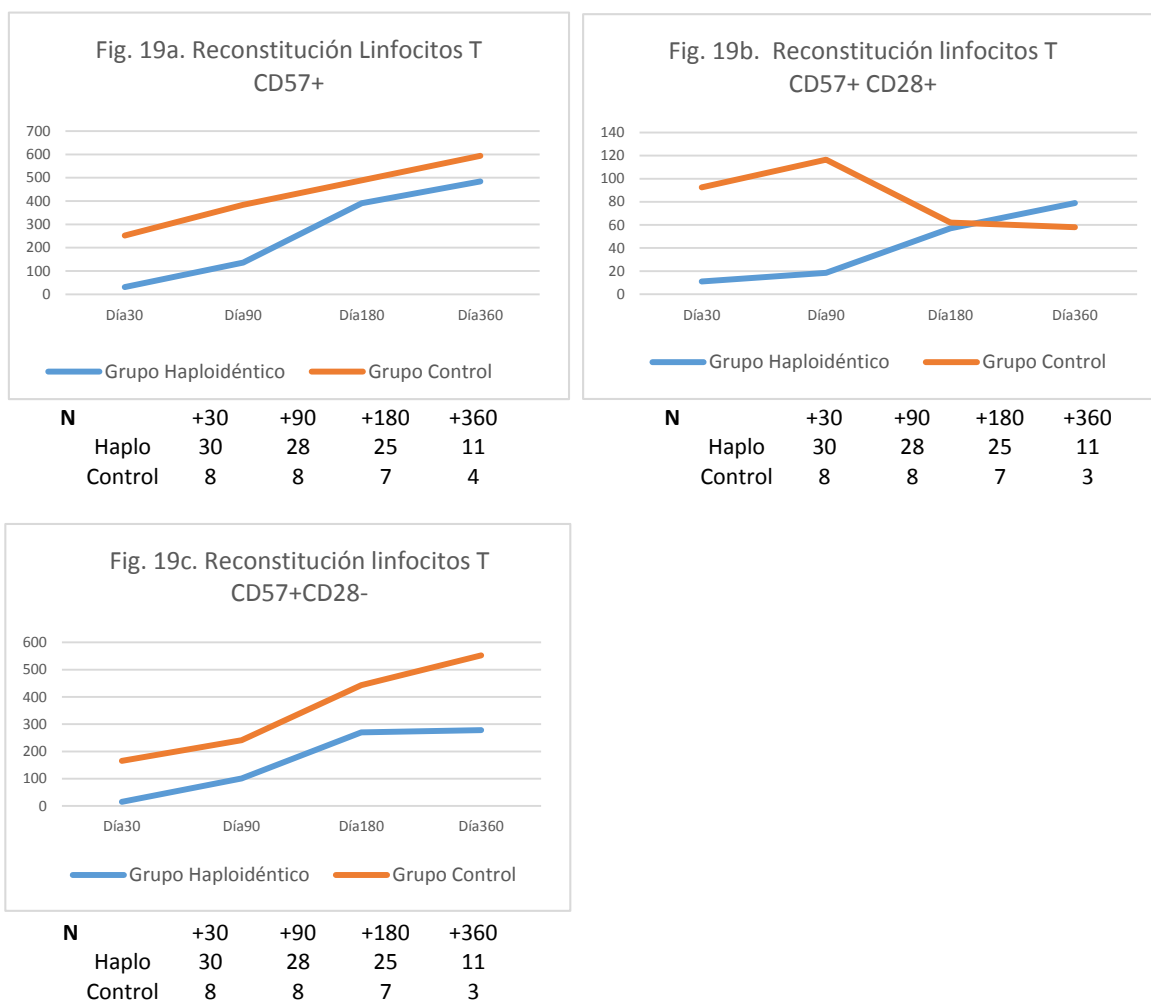


Figura 19. Reconstitución de linfocitos T citotóxicos CD3+CD8+CD57+ en ambos grupos.

%CD28+/Día	Grupo Haploidéntico				Grupo Control				p
	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
%CD28+Día30	30	52,14	35,83	69,52	8	38,36	20,34	52,80	0,089
%CD28+Día90	28	22,61	8,91	38,04	8	31,97	20,18	42,70	0,251
%CD28+Día180	25	16,82	10,54	28,16	7	27,70	6,54	43,62	0,624
%CD28+Día360	11	22,09	10,90	38,88	3	11,09	7,76	34,32	0,456

Tabla 11. Porcentaje de linfocitos T citotóxicos CD3+CD8+CD57+ con expresión de CD28 positivo.

- ✓ Linfocitos citotóxicos diferenciados CD3+CD8+CD57+ menores en el grupo haploidéntico en día +30
- ✓ Similares en ambos grupos a partir del día +90
- ✓ Linfocitos CD3+CD8+CD57+CD28+ menores en grupo haploidéntico hasta el día +180
- ✓ Linfocitos CD3+CD8+CD57+CD28- similares en ambos grupos a partir del día +90

6.2.1.4. Linfocitos T activados con expresión de HLADR+ y CD38+

Se analizaron los linfocitos T CD4+ y CD8+ con expresión de marcadores de activación CD38+ y HLADR+. No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos totales de linfocitos T activados CD4+ y CD8+ entre los grupos en ninguno de los momentos estudiados, sin embargo, los recuentos fueron mayores en el grupo control en el día +30, y mayores en el grupo haploideéntico en el día +90 y +180, igualándose en el +360 (tabla 12;figura 20).

Tabla 12. Recuentos de los linfocitos T CD4+ y CD8+ con expresión de marcadores de activación en ambos grupos, expresados en células por microlitro.

Día	Subpoblación	Grupo Haploideéntico				Grupo control				p
		N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
30	CD4+DR+38+	30	12,00	6,00	34,50	8	24,50	13,50	131,25	0,089
	CD8+DR+38+	30	38,00	15,50	74,25	8	120,00	15,75	288,75	0,171
90	CD4+DR+38+	28	29,00	16,50	57,50	8	18,50	11,25	42,25	0,421
	CD8+DR+38+	28	72,50	23,25	168,75	8	23,50	9,50	167,75	0,562
180	CD4+DR+38+	25	31,00	7,00	52,50	7	16,00	12,00	41,00	0,789
	CD8+DR+38+	25	87,00	21,50	284,50	7	45,00	5,00	131,00	0,191
360	CD4+DR+38+	11	21,00	6,00	39,00	4	30,00	11,75	53,50	0,571
	CD8+DR+38+	11	42,00	3,00	166,00	4	102,50	22,50	160,75	0,661

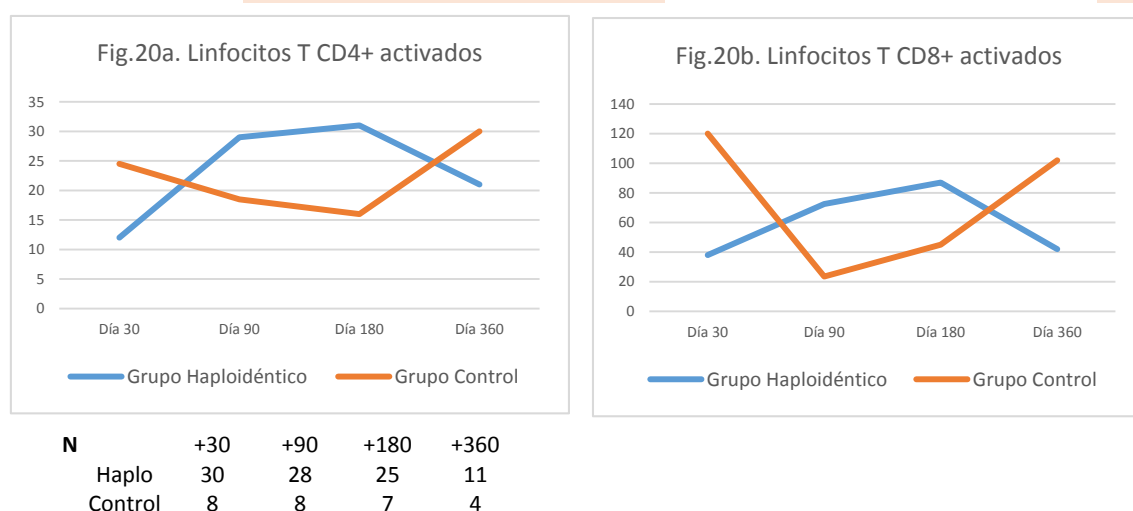


Figura 20. Reconstitución de linfocitos T con expresión de marcadores de activación.

✓ No diferencias entre los grupos en los linfocitos activados

6.2.1.5. Linfocitos T reguladores

Los linfocitos T reguladores (CD4+CD25+CD127+débil/-) fueron menores en el grupo haploidéntico en el primer mes (p 0,00), pero mostraron una rápida reconstitución a partir de este momento (tabla 13). A los 3 meses (+90) los recuentos eran similares a los del grupo control, a pesar de que los recuentos totales de linfocitos T CD4+ aún eran menores en este día en el grupo haploidéntico.

Subpoblación/Día	Grupo Haploidéntico				Grupo Control				p
	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
LTReguladores Día 30	30	7,00	4,00	12,25	8	29,50	17,00	38,00	0,000
LTReguladores Día 90	27	20,00	12,00	34,00	8	19,00	14,75	22,75	0,743
LTReguladores Día 180	25	27,00	12,50	36,00	7	23,00	7,00	30,00	0,474
LTReguladores Día 360	11	23,00	19,00	30,00	4	23,50	19,00	51,25	0,949

Tabla 13. Comparación de los recuentos de Linfocitos T reguladores entre ambos grupos, expresados en células por microlitro.

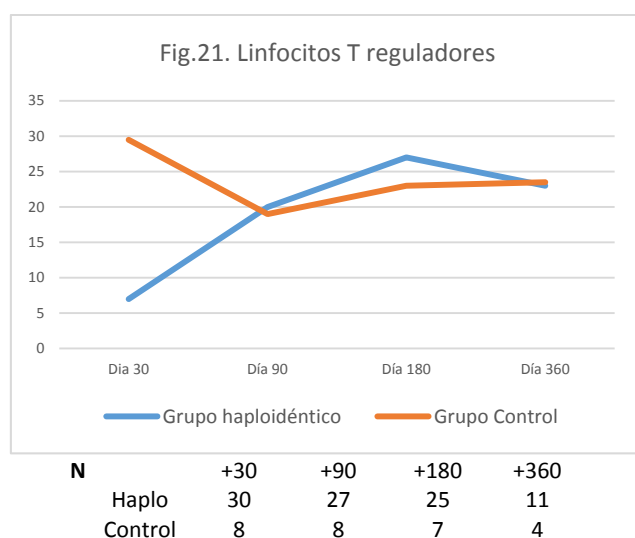


Figura 21. Reconstitución de Linfocitos T reguladores

- ✓ Linfocitos T CD4+ reguladores menores en el grupo haploidéntico en día +30
- ✓ Rápida recuperación en el grupo haploidéntico. Recuento similares al grupo control en día +90.

6.2.2. Poblaciones linfoides B

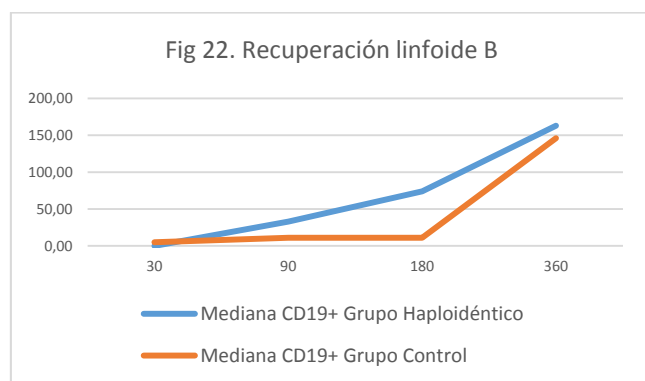
Los linfocitos B CD19+ fueron significativamente menores en el grupo haploidéntico en el día +30 ($p = 0.004$), sin embargo, aunque sin diferencias estadísticamente significativas, a partir de los 3 meses el grupo de trasplante haploidéntico mostró mejor recuperación linfoide B que el grupo control (tabla 14; figura 22).

La recuperación linfoide B alcanzó niveles normales en el día +180 en el grupo haploidéntico, y en el día +360 en el grupo control.

Tabla 14. Recuentos linfocitos B en ambos grupos, expresados en células por microlitro.

Día	Grupo Haploidéntico				Grupo Control				P
	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
Día 30	30	0,00	0,00	0,00	8	5,00	,50	8,00	0,004
Día 90	27	33,00	2,00	115,00	7	11,00	0,00	17,00	0,127
Día 180	21	74,00	3,50	318,00	6	11,00	0,00	29,00	0,110
Día 360	11	163,00	93,00	427,00	5	146,00	42,50	345,50	0,583

Figura 22. Reconstitución linfoide B en ambos grupos.



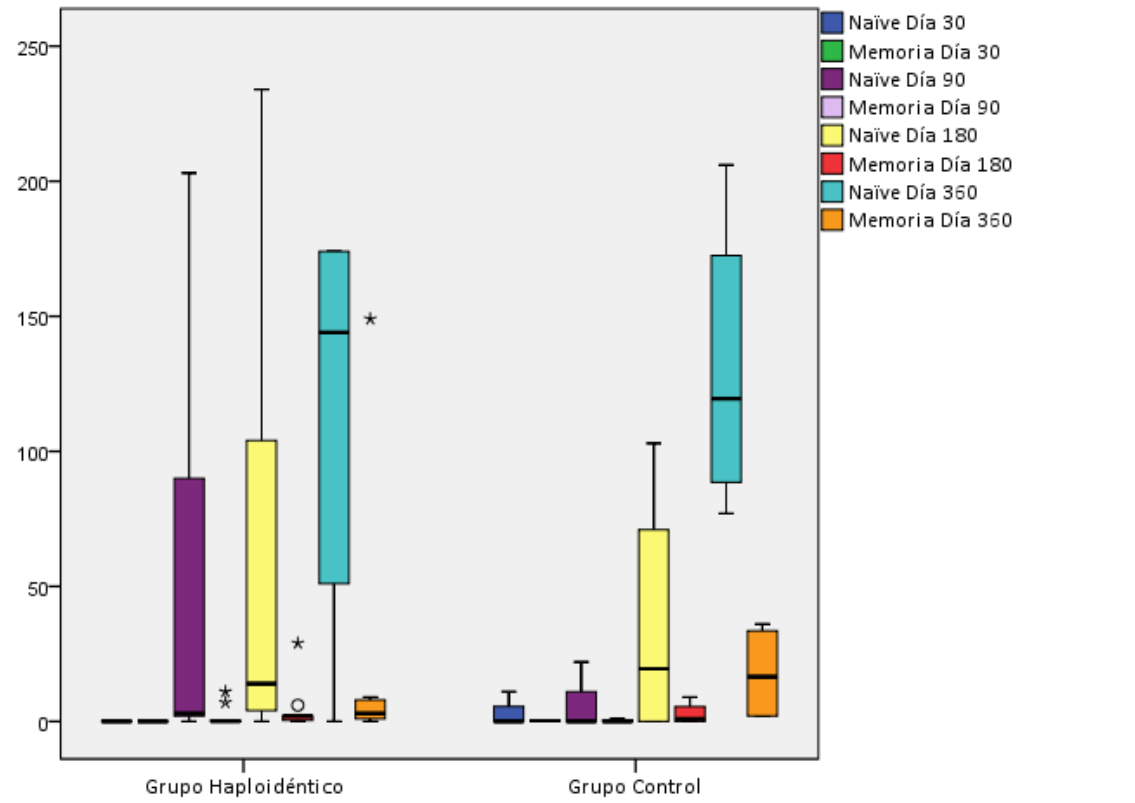
N	+30	+90	+180	+360
Haplo	30	27	21	11
Control	8	7	6	5

La reconstitución se realizó fundamentalmente a expensas de células linfoides B naïve (CD19+ IgD + CD27-), sin experiencia inmunológica, en ambos grupos. Solo en el punto +360 aparecieron recuentos significativos de células B de memoria (CD19+ IgD + CD27+) (tabla 15; figura 23).

Tabla 19. Recuentos absolutos de Linfocitos B naïve y de memoria en ambos grupos, expresados en células por microlitro

Dia	Subpoblación	Grupo Haploidéntico				Grupo Control				p
		N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
30	Naïve	30	0,00	0,00	0,00	8	,65	,03	9,25	0,002
	Memoria	30	0,00	0,00	0,00	8	,45	,13	,93	0,000
90	Naïve	28	29,00	3,00	118,00	8	11,50	0,00	19,75	0,099
	Memoria	28	,50	,10	6,00	8	,20	0,00	1,00	0,221
180	Naïve	23	70,00	4,00	234,00	7	14,00	0,00	39,00	0,118
	Memoria	23	2,00	,40	9,00	7	,80	0,00	2,00	0,144
360	Naïve	11	144,00	51,00	342,00	4	119,50	82,75	189,25	0,851
	Memoria	11	4,00	1,00	9,00	4	16,50	2,00	34,75	0,661

Figura 23. Distribución de los linfocitos B en linfocitos B naïve y de Memoria en ambos grupos. Resultados expresados en células/microlitro



La recuperación de las inmunoglobulinas en el grupo de trasplante haploideéntico siguió el patrón habitual, el subtipo IgM fue el primero en alcanzar niveles normales en el día +180, seguido de la IgG, que fue normal en el día +360 y por último de la IgA, que no sobrepasó el límite inferior de la normalidad durante todo el periodo de seguimiento del estudio (hasta día +360).

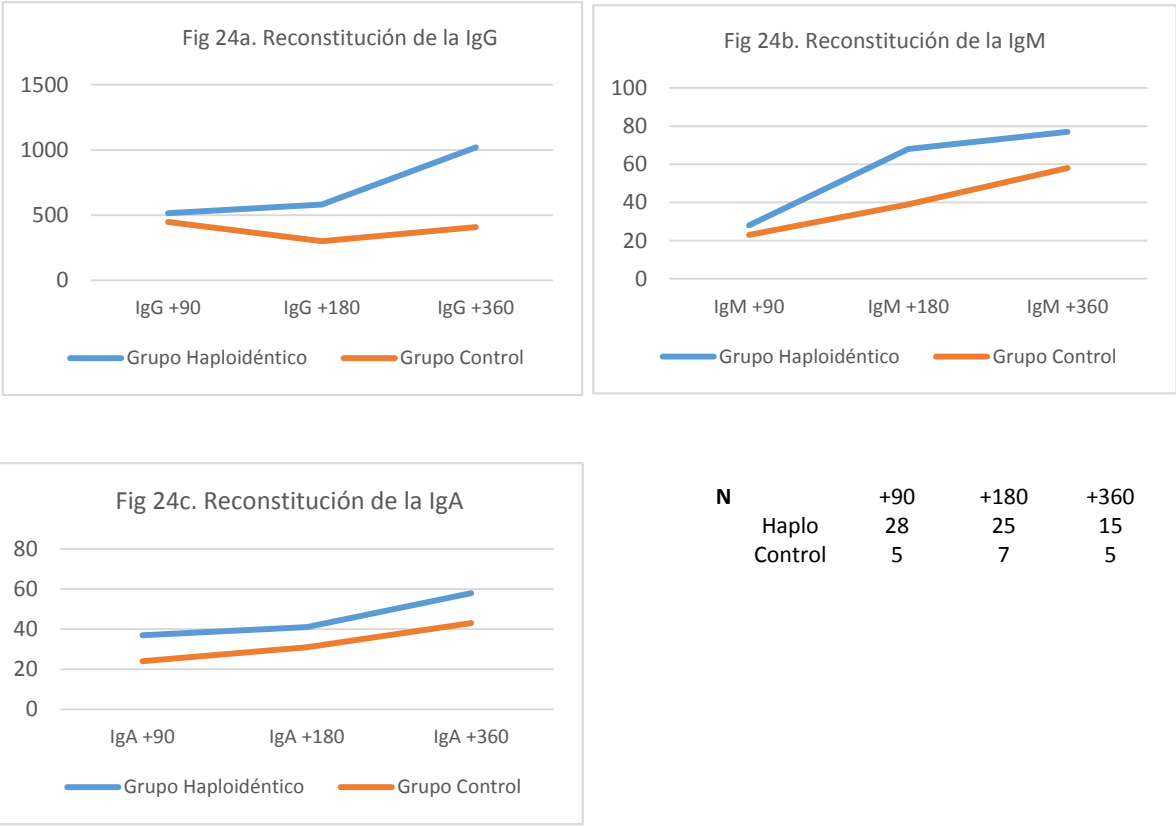
En cuanto a la comparación entre ambos grupos, en el día +90 no hubo diferencias; en el día +180 se objetivó una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de IgM e IgG, mejores en el grupo haploideéntico ($p=0,03$ y $p=0,002$); en el día +360, aunque los niveles fueron mayores en el grupo haploideéntico, no aparecieron diferencias con significación estadística (tabla 16;figura 24).

	Grupo haploideéntico				Grupo control				p
	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
IgG Día +90	28	515,50	361,50	680,75	5	448,00	227,00	493,00	0,142
IgM Día +90	28	28,25	18,60	67,30	5	23,10	14,85	44,65	0,391
IgA Día +90	28	37,6	18,05	50,27	5	24,30	16,15	75,55	0,827
IgG Día +180	25	581,00	434,50	825,00	7	301,00	264,00	427,00	0,002
IgM Día+180	25	68,50	40,75	137,00	7	39,10	8,40	60,60	0,030
IgA Día+180	25	41,60	26,75	64,60	7	31,60	11,80	109,00	0,592
IgG Día +360	15	1020,00	517,00	1380,00	5	409,00	139,00	838,50	0,066
IgM Día +360	15	77,70	54,30	118,00	5	58,30	43,65	94,70	0,306
IgA Día +360	15	58,10	46,10	88,80	5	43,20	16,60	90,90	0,230

Tabla 16. Niveles de inmunoglobulinas en los puntos de estudio entre ambos grupos, expresadas en mg/dL.

- ✓ Recuperación linfocitos B peor en grupo haploideéntico en día +30
- ✓ Recuperación similar en ambos grupos a partir del día +90
- ✓ Reconstitución predominante a partir de linfocitos B naïve en ambos grupos
- ✓ Linfocitos B de memoria aparecen a partir del día +360 en ambos grupos
- ✓ Secuencia de recuperación de inmunoglobulinas IgM(+180)>>IgG(+360)>>IgA

Figura 24. Reconstitución IgG , IgM , IgA en ambos grupos (mg/dL).



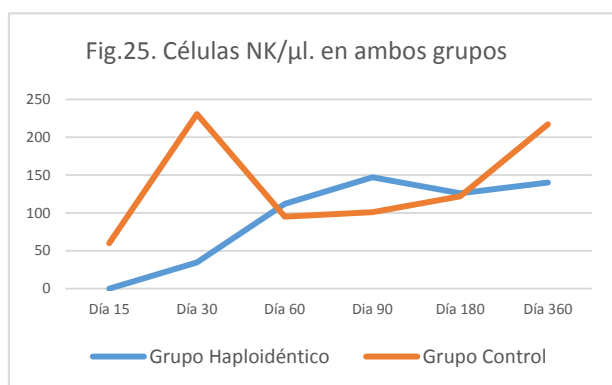
6.2.3. Población Natural Killer

La población de células NK fue la primera en reconstituirse en ambos grupos. Alcanzó niveles normales en el día +30 en el grupo control y en el día +60 en el grupo haploide.

Comparativamente, en el grupo haploide los recuentos totales fueron significativamente menores que en el grupo control en el día +15 (p 0,00) y +30 (p 0,005), y similares desde el día +60 en adelante (tabla 17;figura 25).

Tabla 17. Recuentos totales de células NK expresadas en células/microlitro.

Subpobl./Día	Grupo haploidéntico				Grupo control				p
	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
NK Día 15	23	0,00	0,00	2,00	7	60,00	52,00	125,00	0,000
NK Día 30	30	34,50	16,00	177,00	8	230,50	122,50	387,75	0,005
NK Día 60	27	112,00	52,00	225,00	7	95,00	42,00	119,00	0,617
NK Día 90	28	147,00	84,25	211,75	8	101,00	63,25	177,75	0,358
NK Día 180	21	126,00	84,50	193,00	6	122,50	58,00	157,00	0,476
NK Día 360	11	140,00	68,00	206,00	5	217,00	136,50	510,00	0,180



N	+15	+30	+60	+90	+180	+360
Haplo	23	30	27	28	21	11
Control	7	8	7	8	6	5

Figura 25. Reconstitución NK en ambos grupos

En cuanto a la distribución de las células NK en CD56^{bright} (inmaduras) y CD56^{dim} (maduras), la reconstitución NK en el grupo haploidéntico se realizó fundamentalmente a expensas de la subpoblación CD56^{bright}, mientras que ya desde el día +15 en el grupo control predominaba la subpoblación CD56^{dim}. El porcentaje de células NK CD56^{bright} en el grupo haploidéntico aumentó hasta el día +30 (77%), y posteriormente disminuyó progresivamente hasta el final del seguimiento (hasta el día +90). En el grupo control el porcentaje máximo de células inmaduras CD56^{bright} se observó en el día +15 (20%), y posteriormente también fue disminuyendo. Comparativamente, el porcentaje de células NK CD56^{bright} en el grupo haploidéntico y control fue similar en el día +15, y mayor en el grupo haploidéntico durante todo el seguimiento (+30, +60, +90), con diferencias estadísticamente significativas (p0,00, 0,00, 0,02) (Tabla 18 y figura 26).

Tabla 18. Porcentaje de células NK inmaduras y maduras, con expresión alta y baja de CD56 (CD56^{bright} y CD56^{dim})

	Grupo haploidéntico				Grupo control				p
	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
Día 15									
% CD56 ^{bright}	14	15,50	0,00	36,25	7	20,00	14,00	42,00	0,360
% CD56 ^{dim}	14	53,00	0,00	80,25	7	80,00	53,00	86,00	0,110
Día 30									
% CD56 ^{bright}	29	77,00	68,50	88,50	8	21,50	11,25	30,00	0,000
% CD56 ^{dim}	29	15,00	9,50	28,50	8	77,50	67,75	87,75	0,000
Día 60									
% CD56 ^{bright}	27	38,00	25,00	48,00	7	8,00	8,00	13,00	0,000
% CD56 ^{dim}	27	61,00	48,00	75,00	7	90,00	87,00	92,00	0,000
Día 90									
% CD56 ^{bright}	28	35,00	23,00	43,00	8	20,00	6,25	28,00	0,024
% CD56 ^{dim}	28	62,00	53,25	75,00	8	78,50	71,50	93,25	0,015

De forma paralela la expresión de NKG2A, marcador relacionado con células inmaduras, aumentó en el grupo haploidéntico y grupo control hasta el día +30 (84% y 59% respectivamente), y posteriormente disminuyó lentamente en el grupo haploidéntico y se mantuvo estable en el grupo control.

Comparativamente, la expresión de NKG2A fue mayor en el grupo control en el día +15 (52% vs 2%) (p 0,006), y mayor en el grupo haploidéntico en el día +30 y +60 (p<0,05) (tabla 19, figura 24).

La expresión de los receptores no KIR estudiados activatorios NKp46 y NKp30 y del inhibitorio NKG2D fue menor en el grupo haploidéntico en el día +15 y similar en ambos grupos a partir del día +30. En el día +30, la expresión de NKP46 tendió a ser mayor en el grupo haploidéntico, con significación límite p 0.05 (tabla 19; figura 27 y 28).

Tabla 19. Expresión de marcadores no KIR en las células NK en ambos grupos.

Día	Subpoblación	Grupo Haploidéntico				Grupo Control				p
		N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
Día 15	% NKp46	14	2,50	0,00	35,50	7	68,00	56,00	81,00	0,010
	% NKG2D	14	0,00	0,00	12,00	7	76,00	34,00	81,00	0,000
	% NKp30	13	0,00	0,00	29,50	7	28,00	17,00	45,00	0,081
	% NKG2A	13	2,00	0,00	34,00	7	52,00	44,00	67,00	0,006
Día 30	% NKp46	29	81,00	54,50	92,50	8	59,50	42,50	69,50	0,051
	% NKG2D	29	58,00	21,50	70,50	8	56,50	32,50	69,75	0,814
	% NKp30	29	21,00	5,50	31,50	8	16,50	9,00	31,75	0,957
	% NKG2A	27	84,00	77,00	93,00	8	59,50	40,25	63,50	0,000
Día 60	% NKp46	27	73,00	55,00	80,00	7	58,00	40,00	62,00	0,107
	% NKG2D	26	54,50	41,75	67,50	7	32,00	21,00	62,00	0,503
	% NKp30	26	7,50	3,00	22,25	7	7,00	5,00	28,00	0,780
	% NKG2A	25	72,00	61,00	85,50	7	51,00	34,00	57,00	0,001
Día 90	% NKp46	27	63,00	43,00	77,00	8	52,00	40,75	67,75	0,428
	% NKG2D	27	68,00	29,00	75,00	8	65,50	26,00	75,25	0,714
	% NKp30	27	4,00	2,00	8,00	8	4,50	,75	10,75	0,985
	% NKG2A	26	62,00	53,75	77,00	8	58,00	40,25	65,25	0,152

Figura 26. Porcentaje de Células NK CD56^{bright} /Expresión de NKG2A en ambos grupos

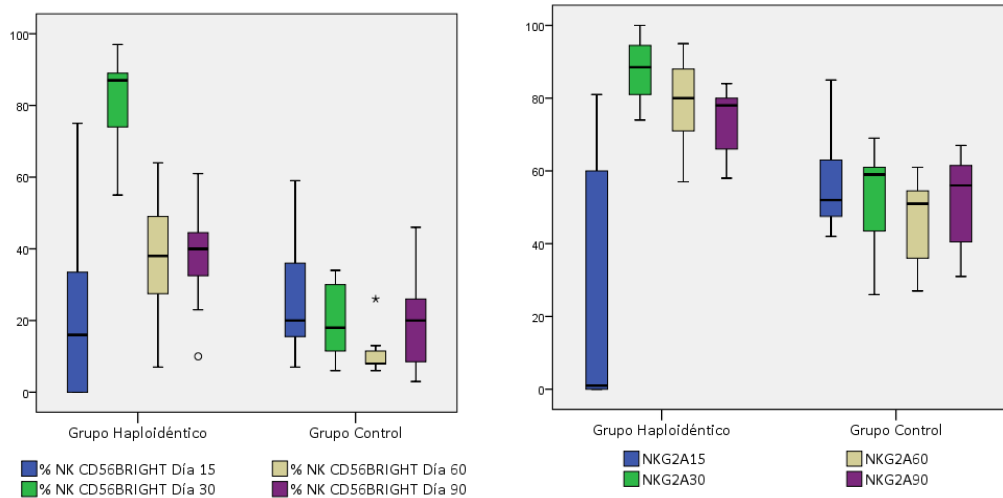


Figura 27. Porcentaje de expresión de NKp46 y NKp30 en ambos grupos

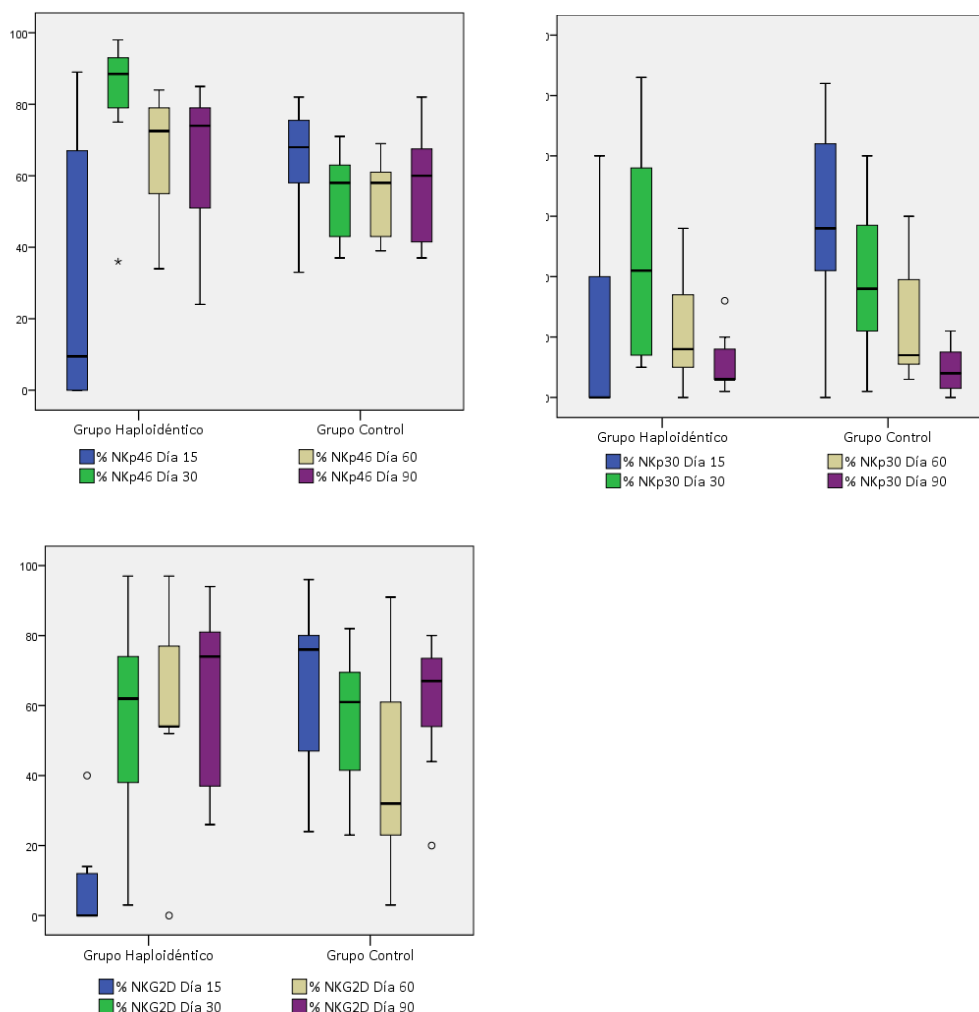


Figura 28. Porcentaje de expresión de NKG2D en ambos grupos

- ✓ La subpoblación NK es la primera en reconstituirse : + 30 grupo control; +60 grupo haploidentico
- ✓ En grupo haploidentico reconstitución predominante subpoblación NK CD56bright/NKG2A+
- ✓ Células NK inmaduras CD56bright/NKG2A+ mayores en grupo haploidentico frente a grupo control desde día +30 hasta +90.
- ✓ Expresión similar en ambos grupos de receptores no KIR NKp46, NKp30, NKG2D

6.3. Análisis de la relación entre reconstitución inmune y Enfermedad

Injerto contra Receptor.

En la tabla 20 y figuras 29-32 se muestra la comparación de las poblaciones linfoides T entre aquellos pacientes que desarrollaron EICR aguda (EICRa) y aquellos que no lo desarrollaron dentro del grupo de estudio haploidentico.

En cuanto a los recuentos las poblaciones linfoides T totales, CD4+ y CD8+, fueron similares en el día +30 y +90. Extendiendo el análisis al día +180, en este punto tanto los linfocitos T totales CD3+ como los CD4+ y los CD8+ fueron significativamente mejores en el grupo sin EICRa ($p < 0.05$). En relación a la reconstitución de origen tímico, las células CD4+ de fenotipo naïve (CD45Rahigh CD62L+ o CD27+) fueron significativamente mejores en el grupo de pacientes que no desarrollaron EICRa en el día +30 y +90. De forma paralela los linfocitos CD4+ de origen tímico temprano con expresión de CD31+ (CD45Rahigh CD31+) también tuvieron recuentos significativamente mayores en ambos puntos del seguimiento en los pacientes sin EICRa ($p = 0.02$ y 0.03). En el día +180, momento en el que se debe objetivar una reconstitución timo-dependiente adecuada, los linfocitos T CD4+ naïve y tímicos tempranos también fueron mejores en el grupo sin EICRa, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0.06$ y $p = 0.06$ respectivamente).

Se observaron también recuentos mayores de linfocitos T CD4+ y CD8+ activados con expresión de CD38+ y DR+ en el grupo sin EICRa, con significación estadística en el día +30 ($p = 0.02$, 0.01).

Los linfocitos T reguladores fueron mejores en el grupo sin EICRa en el día +30 ($p < 0.05$), sin objetivar diferencias significativas en puntos posteriores de estudio.

En cuanto a la reconstitución inmune precoz en el día +15 (NK, T y ratio T/NK), no se objetivaron diferencias significativas entre los pacientes con y sin EICRa, aunque hubo una tendencia a tener mejores linfocitos T y mejor ratio T/NK en los pacientes que no desarrollaban posterior EICRa.

La comparación de las subpoblaciones NK entre aquellos pacientes con y sin EICRa se muestra en la tabla 21 y figura 33.

Los recuentos totales de células NK fueron similares en el día +15, mejores en el grupo sin EICRa en los días +30 y +60 (p no significativa), y de nuevo similares en el día +90. En cuanto a las subpoblaciones NK maduras e inmaduras, los pacientes sin EICRa tuvieron mayor porcentaje de células CD56+^{dim} (fenotipo maduro) y menor de CD56+^{bright} (fenotipo inmaduro) en los días +30 (p ns), +60 ($p < 0.05$) y +90 ($p < 0.05$). De forma paralela la expresión del marcador inmaduro NKG2A fue mayor en aquellos pacientes afectados por la EICRa. La expresión del resto de marcadores NK no KIR estudiados fue similar en ambos grupos, con mayor expresión del marcador activador NKp46 en los pacientes con EICRa en los días + 60 (p no significativa), y +90 ($p < 0.05$).

Tabla 20. Medianas y comparación de subpoblaciones en el grupo haploidéntico entre los pacientes sin y con EICR aguda.

Subpoblación/Día	No EICR aguda(N=9)				EICR aguda(N=21)				p
	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
Linfocitos T									
T Día+15	7	28,00	19,00	48,00	17	8,00	3,50	18,00	0,114
NK Día+15	7	0	0	6	16	0	0	1	0,671
RatioT/NK Día+15	7	9,0	0,9	39,0	17	6,0	0,5	15,9	0,494
CD4 Día+15	5	25,00	13,00	36,00	11	7,00	5,00	43,00	0,320
CD8 Día+15	5	8,00	4,00	21,00	12	2,00	1,25	14,75	0,082
T Día +30	9	75,90	44,00	240,50	21	132,00	95,00	209,00	0,372
CD4 Día +30	9	30,90	19,00	82,50	21	45,00	17,00	74,30	0,790
CD8 Día +30	9	45,30	22,50	90,50	21	83,00	29,50	150,00	0,349
T Día +90	7	512,00	203,00	1946,00	20	384,00	175,50	865,25	0,341
CD4 Día +90	7	162,00	82,00	366,00	20	182,00	98,25	210,75	0,850
CD8 Día +90	7	418,00	120,00	998,00	20	136,50	62,00	655,75	0,179
T Día +180	5	1384,00	945,00	1966,50	16	629,50	348,25	1090,75	0,019
CD4 Día +180	5	321,00	257,00	558,50	16	214,00	101,75	297,75	0,032
CD8 Día +180	5	1125,00	614,50	1277,50	16	431,50	158,00	773,00	0,040
Activados									
CD4DR38+ Día +30	9	28,00	22,50	70,00	21	11,00	6,00	39,50	0,028
CD8DR38+ Día +30	9	115,00	39,00	251,50	21	32,00	6,50	67,50	0,011
CD4DR38+ Día +90	9	44,00	21,00	97,50	19	27,00	9,00	46,00	0,105
CD8DR38+ Día +90	9	176,00	45,50	405,50	19	32,00	5,00	106,00	0,022
T reguladores									
LTReg Día +30	9	16,00	12,00	29,50	21	6,00	4,00	13,50	0,040
LTReg Día +90	9	27,00	14,00	39,00	19	20,00	15,00	24,00	0,562
Linfocitos Naïve									
CD4+Naïve Día +30	9	5,00	4,00	20,00	21	2,00	,50	5,50	0,022
CD8+Naïve Día +30	9	20,00	6,00	43,00	21	5,00	1,50	20,00	0,032
CD4+Naïve Día +90	9	11,00	5,00	23,50	19	3,00	1,00	13,00	0,048
CD8+Naïve Día +90	9	34,00	14,50	65,00	19	12,00	7,00	45,00	0,188
CD4+Naïve Día +180	9	13,00	9,50	88,00	17	8,00	4,00	17,00	0,066
CD8+Naïve Día +180	9	48,00	25,50	93,00	17	45,00	15,00	115,00	0,874
Linfocitos tímicos									
CD4+CD31+Día+30	9	6,00	4,50	14,50	21	2,00	0,00	6,00	0,025
CD8+CD31+Día+30	9	14,00	5,00	100,50	21	8,00	3,00	12,00	0,070
CD4+CD31+Día+90	9	7,00	4,50	26,00	19	3,00	2,00	7,00	0,037
CD8+CD31+Día+90	9	87,00	40,50	230,50	19	30,00	5,00	97,00	0,019
CD4+CD31+Día+180	9	12,00	7,00	48,50	17	4,00	2,50	14,50	0,066
CD8+CD31+Día+180	9	117,00	64,00	243,00	17	116,00	41,00	186,00	0,711

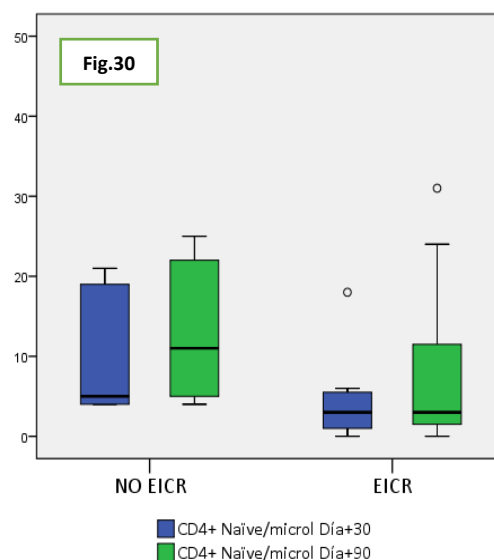
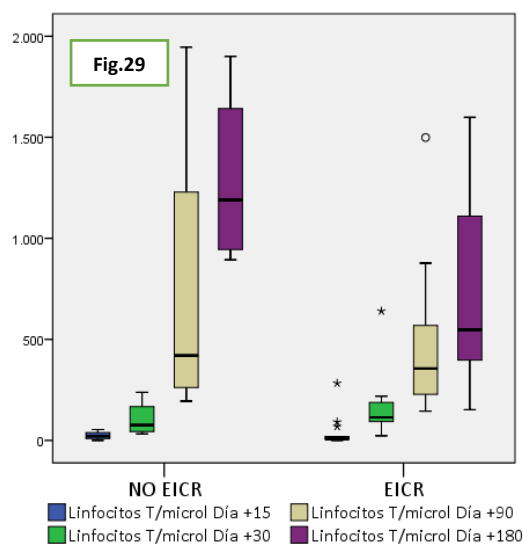


Figura 29. Linfocitos T totales según la presencia o no de EICR aguda. Figura 30. Linfocitos T CD4+ naïve por microlitro según la presencia o no de EICR aguda

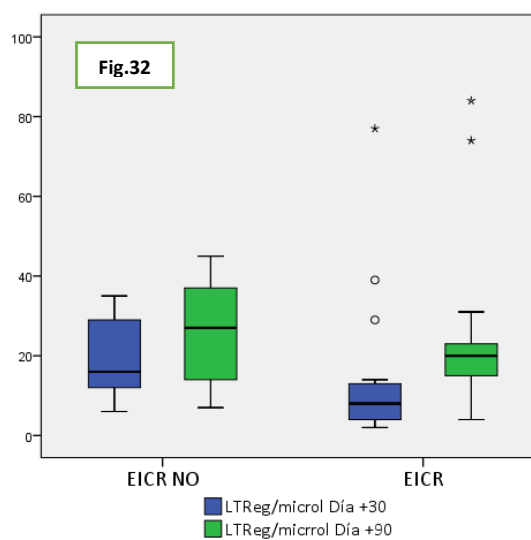
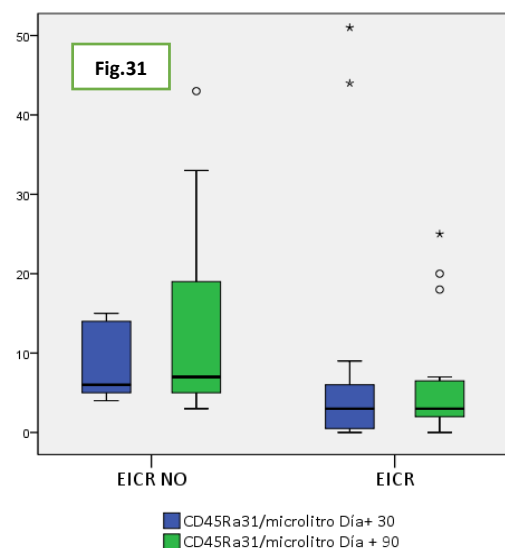


Figura 31. Linfocitos T CD4+ de origen tímico según la presencia o no de EICR aguda. Figura 32. Linfocitos T CD4+ reguladores por microlitro según la presencia o no de EICR aguda

Tabla 21. Medianas y comparación de subpoblaciones NK y expresión de receptores no KIR en el grupo haploidéntico entre los pacientes con y sin EICR aguda.

	No EICR aguda(N=9)				EICR aguda(N=21)				
Subpoblación	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	p
Día +30									
NK totales/μL	9	151,00	59,00	235,00	21	29,00	13,50	244,50	0,125
CD56 ^{bright} (%)	9	42,00	30,00	82,50	20	78,50	32,50	87,75	0,390
CD56 ^{dim} (%)	9	54,00	15,00	68,50	20	15,00	9,25	40,00	0,153
NKP46+(%)	9	69,00	59,50	86,00	20	79,50	42,50	89,50	0,799
NKG2D+(%)	9	63,00	37,00	72,00	20	55,00	26,50	66,25	0,390
NKP30+(%)	9	15,00	9,00	31,00	20	18,00	6,00	36,50	0,871
NKG2A+(%)	8	75,50	60,50	93,50	19	82,00	64,00	90,00	0,856
Día +60									
NK totales/μL	9	115,00	85,00	259,00	19	53,00	46,00	137,00	0,095
CD56 ^{bright} (%)	9	12,00	8,00	25,50	19	41,00	25,00	50,00	0,002
CD56 ^{dim} (%)	9	81,00	74,00	92,00	19	58,00	47,00	75,00	0,002
NKP46+(%)	9	59,00	37,00	65,50	19	71,00	55,00	79,00	0,105
NKG2D+(%)	8	58,00	53,00	83,75	19	54,00	25,00	60,00	0,106
NKP30+(%)	8	5,50	3,25	9,75	19	9,00	5,00	22,00	0,217
NKG2A+(%)	8	59,50	35,00	71,75	19	71,00	57,00	86,00	0,147
Día +90									
NK totales/μL	9	124,00	69,50	197,00	19	122,00	78,00	197,00	1,000
CD56 ^{bright} (%)	9	19,00	10,00	23,00	19	35,00	25,00	44,00	0,001
CD56 ^{dim} (%)	9	80,00	75,50	88,00	19	60,00	53,00	75,00	0,001
NKP46+(%)	9	37,00	34,00	43,00	18	72,50	60,75	79,50	0,000
NKG2D+(%)	9	75,00	50,50	78,50	18	43,00	23,75	71,00	0,118
NKP30+(%)	9	4,00	0,00	10,50	18	4,50	3,00	10,50	0,463
NKG2A+(%)	8	44,50	33,25	57,00	18	69,50	59,50	77,50	0,000

✓ *Pacientes del grupo haploidéntico con EICRa :*

- ✓ *Peor reconstitución T a largo plazo (día +180)*
- ✓ *Peor reconstitución T naïve y de origen tímico*
- ✓ *Peor reconstitución de linfocitos T reguladores precoz (+30)*
- ✓ *Mayores recuentos de Células NK inmaduras y menores de células NK maduras.*
- ✓ *Mayor expresión de NKp46*

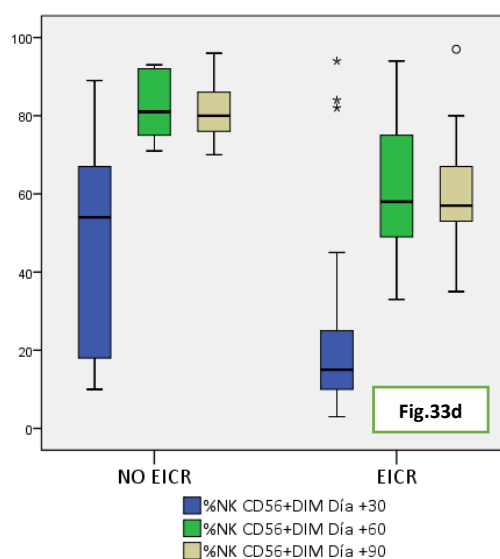
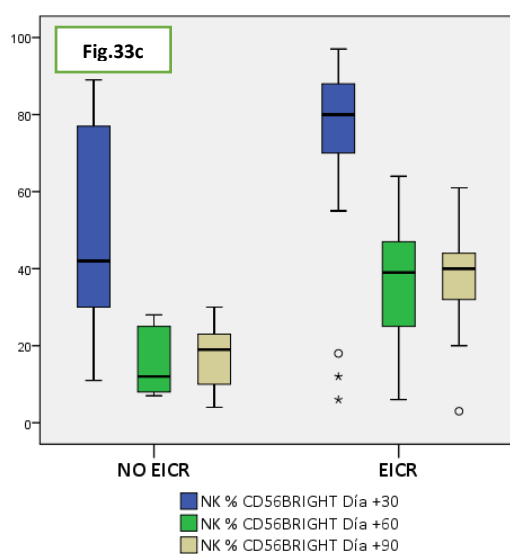
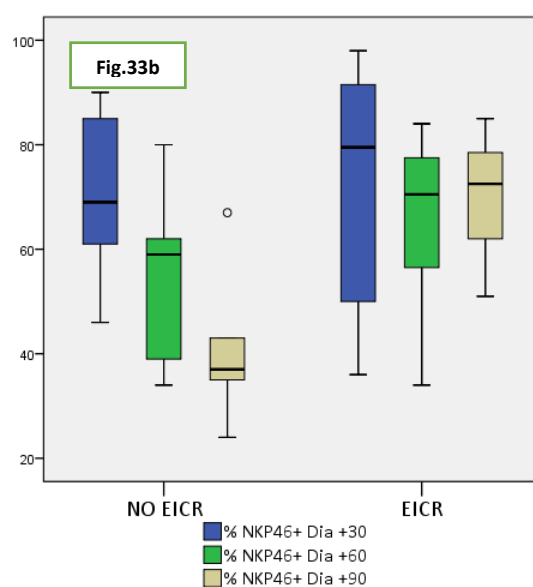
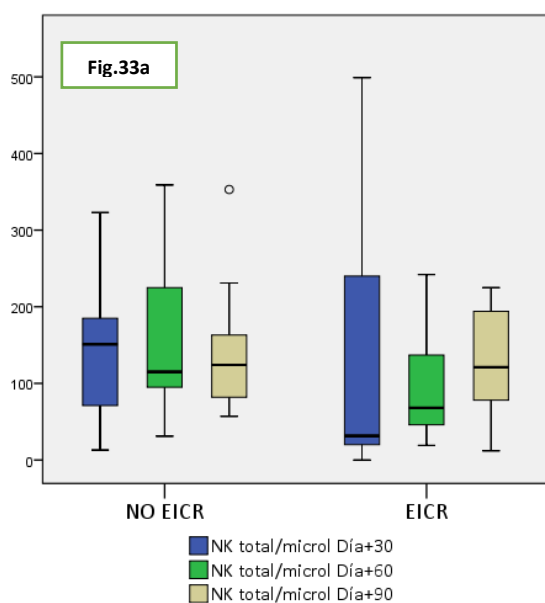
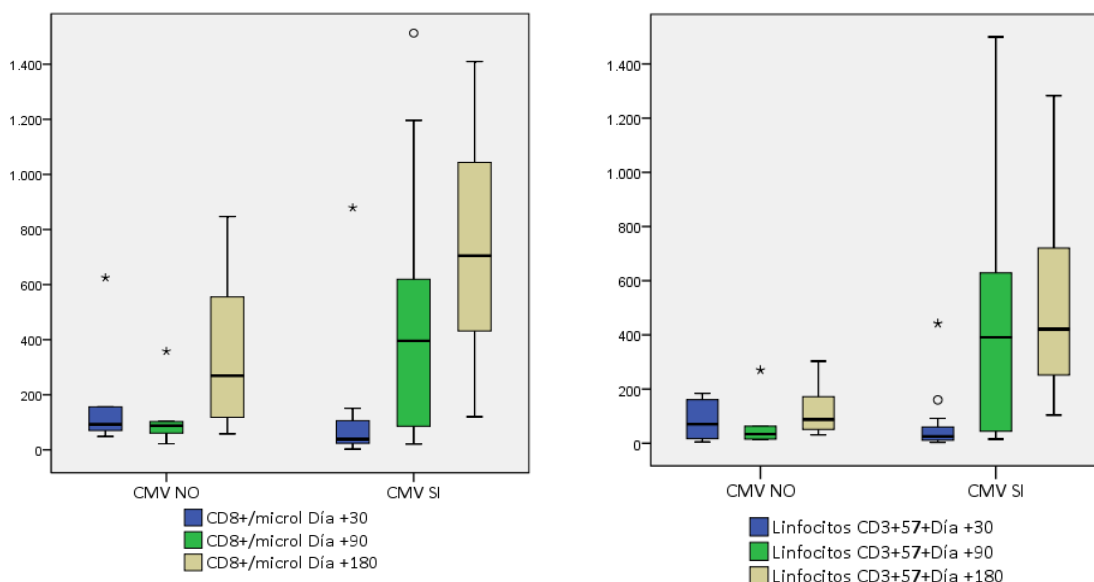


Figura 33.Comparación de reconstitución NK entre pacientes con y sin EICRa. 33a.NK totales por microlitro. 33b. Expresión de NKP46. 33c. Porcentaje de NK inmaduras (CD56^{bright}). 33d. Porcentaje de NKmaduras (CD56^{dim}).

6.4. Análisis de la relación entre reconstitución inmune y reactivación de Citomegalovirus.

La tasa de reactivación CMV en el grupo de estudio fue de 73.3%. La reconstitución inmune de los linfocitos T CD3+, CD4+, CD8+ y células NK en el día +30 postrasplante fue similar en aquellos pacientes que reactivaron y que no reactivaron CMV en los primeros 100 días. A partir de ese momento, los pacientes con reactivación CMV tuvieron mayores recuentos de linfocitos T CD8+ en el día +90 (Mediana 475 (110,25-1078,25)/ μ L vs 92 (61-103) / μ L, p 0.01) y +180 (Mediana 705 (415-1125)/ μ L vs 269(103-628) / μ L, p 0.05) (figura 34). Los recuentos de linfocitos T totales, de CD4+ y de células NK fueron similares a los 3 y 6 meses con y sin reactivación CMV. Los linfocitos T citotóxicos diferenciados CD3+CD8+CD57+ también fueron mayores en los pacientes con reactivación CMV en el día +90 (Mediana 269 (44-629)/ μ L vs 26 (15-63)/ μ L, p 0,008) y +180 (Mediana 421(250-749)/ μ L vs 87,5 (46,00-204,75)/ μ L p 0,001) (figura 34). Analizando los linfocitos T activados (CD38+HLADR+), los linfocitos T reguladores (CD4+CD25+CD127+débil/-), los linfocitos T naïve (CD45Ra high CD62L+ o CD27+) y T de memoria (CD45Ro+), las subpoblaciones NK y la expresión de receptores NK no KIR no se encontraron diferencias relevantes ni estadísticamente significativas entre aquellos pacientes con y sin reactivación CMV.

Figura 34. Subpoblaciones CD8+ y linfocitos T citotóxicos en pacientes con y sin reactivación CMV.



- ✓ *Pacientes del grupo haploidéntico con reactivación CMV :*
 - ✓ *Similar reconstitución inmune que aquellos pacientes que no reactivan CMV*
 - ✓ *Mayores recuentos de linfocitos T CD8+ y citotóxicos diferenciados CD8+CD57+ a partir del día +90*

6.5. Análisis de la relación entre reconstitución inmune y supervivencia.

6.5.1. Supervivencia global

Para determinar si la reconstitución inmune precoz influía en la supervivencia, se analizaron las siguientes variables: los linfocitos totales/ μL a los 30 días (ALC30), los linfocitos T CD3+ totales/ μL en el día +30, los linfocitos T CD4+ o colaboradores/ μL en el día +30 y a los 3 meses (+90).

En el día +30, los linfocitos totales (ALC30) y los linfocitos T CD3+/ μL tuvieron en el análisis de curvas ROC áreas bajo la curva $\geq 0,6$. El punto más discriminativo para los linfocitos totales (ALC30) fue 300/ μL , y para los linfocitos T CD3+ 180/ μL . Realizando un análisis de curvas de supervivencia Kaplan Meyer, los pacientes con $\text{ALC30} > 300/\mu\text{L}$ y con Linfocitos T CD3+ en el día +30 $> 180/\mu\text{L}$ tuvieron mejor supervivencia global, aunque sin significación estadística ($p\ 0,11$ y $p\ 0,19$ respectivamente) (figuras 35 y 36). La supervivencia global estimada al año fue 56% en los pacientes con $\text{ALC30} < 300/\mu\text{L}$ y 78% en aquellos con $\text{ALC30} > 300/\mu\text{L}$, y 58% y 77% en aquellos con < 180 y > 180 linfocitos T CD3+/ μL en el día +30 respectivamente.

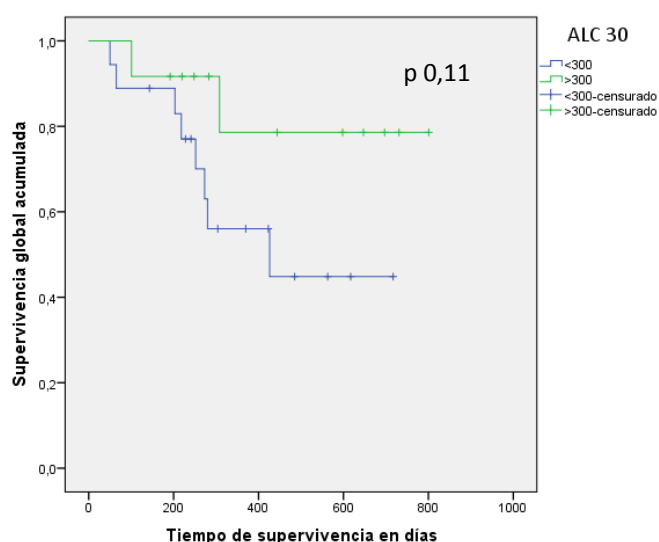


Figura 35. Curvas de supervivencia global según el ALC 30. — Pacientes con < 300 linfocitos totales / μL día +30. — Pacientes con > 300 linfocitos totales / μL día +30

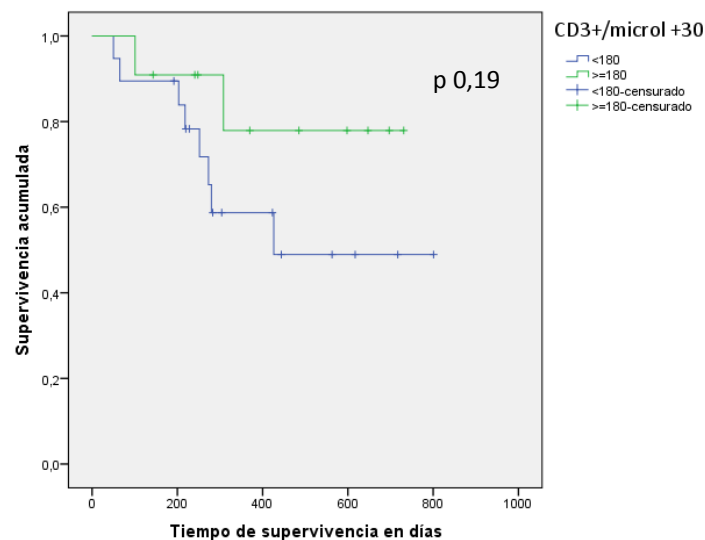


Figura 36. Curvas de supervivencia global según Linfocitos T CD3+ en el día +30. — Pacientes con <180 linfocitos T CD3+/μL día +30 — Pacientes con >180 linfocitos T CD3+/μL día +30

Los linfocitos T CD4+/μL en el día +30 no resultaron discriminativos. Sin embargo, los linfocitos T CD4+/μL en el día +90 presentaron un área bajo la curva de 0,7. El punto más discriminativo fue 200 linfocitos T CD4+/μL. Aquellos pacientes con más de 200 linfocitos T CD4+/μL a los 3 meses (+90) tuvieron mejor supervivencia global, con p no significativa (p 0,15) (figura 37). La supervivencia estimada al año fue 61% frente a 85% en pacientes con <200 y >200 linfocitos T CD4+/ μL.

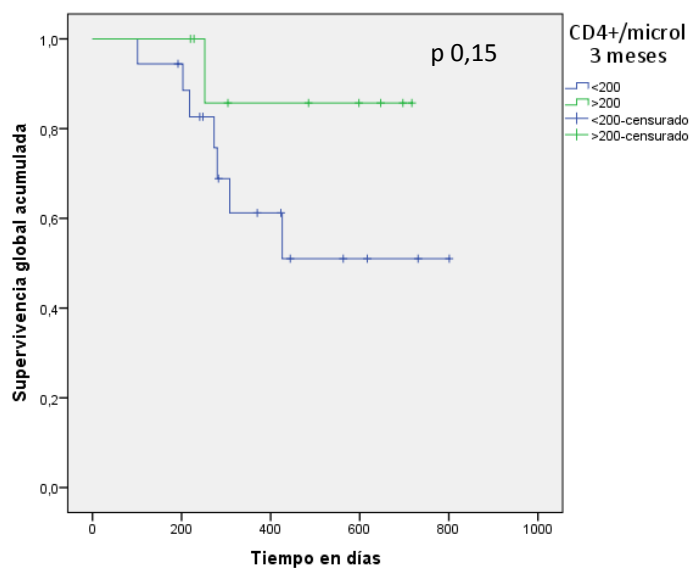


Figura 37. Curvas de supervivencia global según los Linfocitos T CD4+ a los 3 meses. — Pacientes con <200 linfocitos T CD4+/μL día +90 — Pacientes con >200 linfocitos T CD4+/μL día +90

6.5.2. Supervivencia libre de enfermedad

La supervivencia libre de enfermedad (SLE) fue mejor en los pacientes con $ALC30 > 300/\mu L$ (SLE estimada al año 68% frente a 57%), con p no significativa de 0,17 (figura 38).

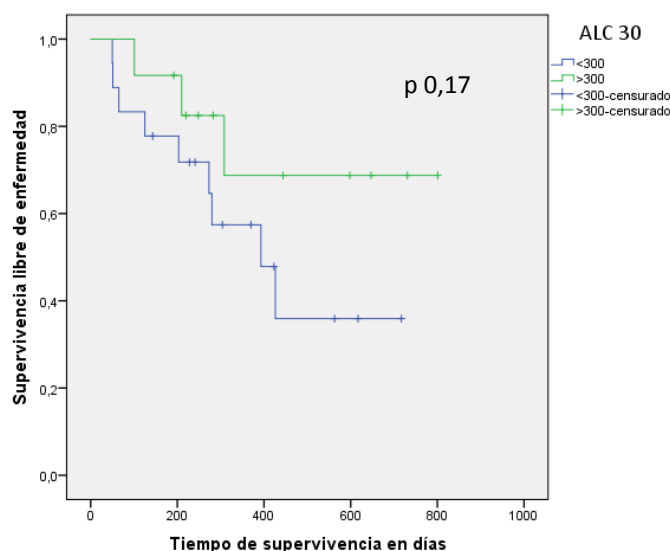


Figura 38. Curvas de supervivencia libre de enfermedad según el ALC 30. — Pacientes con <300 linfocitos totales / μL día +30 — Pacientes con >300 linfocitos totales / μL día +30

No se observaron diferencias ni puntos de corte significativos para la supervivencia libre de enfermedad en el resto de variables analizadas: Linfocitos T totales CD3+/ μL al mes (+30), Linfocitos T CD4+ / μL al mes (+30) y a los 3 meses (+90).

6.5.3. Mortalidad de causa infecciosa.

En cuanto a la mortalidad de causa infecciosa explorando las mismas variables que se han mencionado para la supervivencia global, tanto el recuento linfocitario total en el día +30 (ALC30) como los linfocitos T totales CD3+ en el día+30 presentaron curvas ROC con área bajo la curva $\geq 0,6$. Respetando los mismos puntos de corte utilizados previamente y mediante comparación directa con tablas de contingencia, se observó una relación estadísticamente significativa entre la incidencia de mortalidad de causa infecciosa y tener menos de 300 linfocitos totales (ALC30)/ μL y menos de 180 linfocitos

T CD3+/ μ L en el día +30 (p 0,02). Las curvas de incidencia acumulada de mortalidad infecciosa también mostraron diferencias estadísticamente significativas (figuras 38-41). Los linfocitos T CD4+/ μ L al mes (día +30) y a los 3 meses (día +90) no presentaron puntos de corte discriminativos para la mortalidad de causa infecciosa.

Figura 39. Incidencia acumulada de mortalidad infecciosa en el grupo haploidéntico.

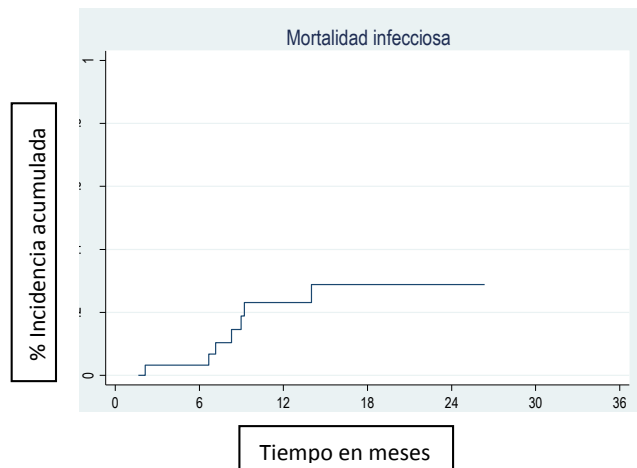


Figura 40. Incidencia acumulada de mortalidad infecciosa según el ALC30.

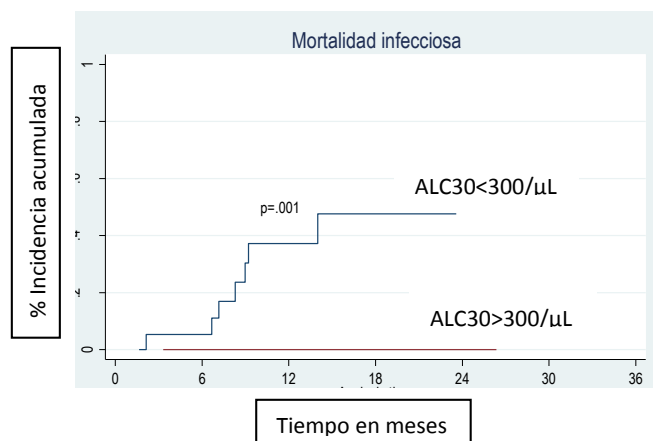
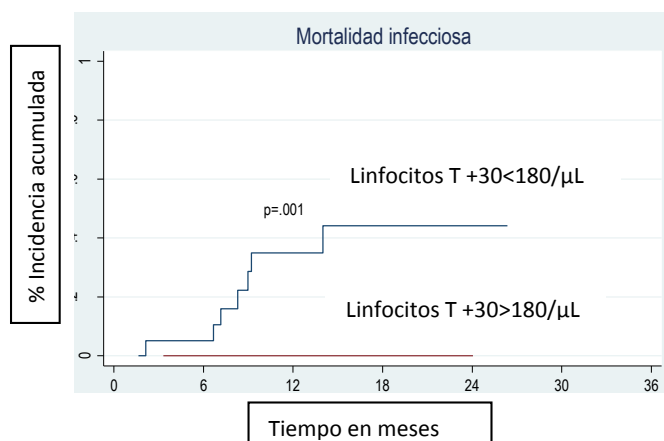


Figura 41. Incidencia acumulada de mortalidad infecciosa según los linfocitos T día +30.



La mortalidad de causa infecciosa estimada al año del trasplante fue de 23% en todo el grupo haploidéntico, 38% frente a 0% en los pacientes con ALC30< y >300/ μ L y 36% frente a 0% en los pacientes con linfocitos T CD3+ en el día +30 < y > de 180/ μ L.

6.5.4. Células NK y supervivencia.

También se exploró la relación entre las células NK CD56^{bright} o inmaduras (porcentaje y recuentos totales por microlitro de células CD56^{bright} a los 15 y 30 días) y la supervivencia. De las 4 variables, solo el porcentaje de células NK CD56^{bright} en el día +30 demostró un área bajo la curva ROC >0,6, con punto de corte discriminativo en 78%. Analizando la supervivencia mediante curvas Kaplan Meyer, aquellos pacientes con porcentaje >78% tuvieron mejor supervivencia global (p 0,04) y libre de enfermedad (p 0,06). Figuras 42 y 43.

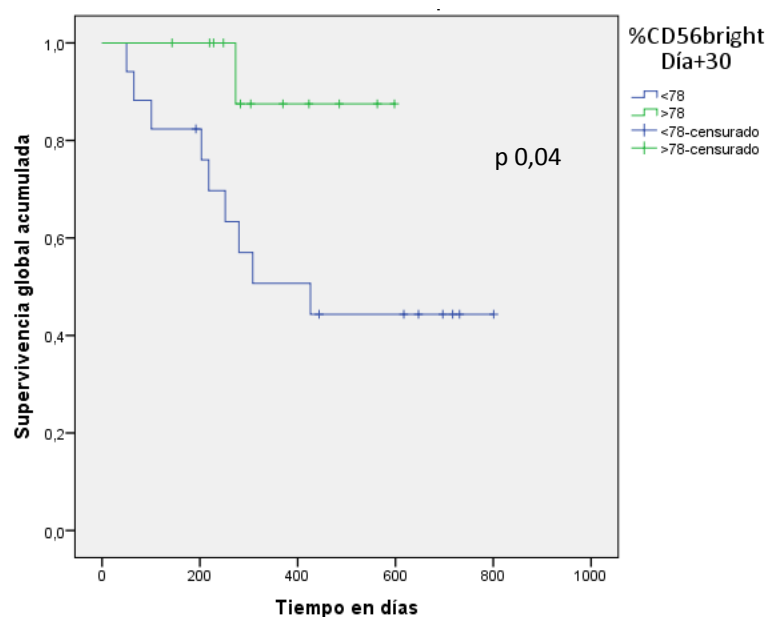


Figura 42. Curvas de supervivencia global según el porcentaje de células NK con expresión intensa de CD56 (CD56^{bright}). — Pacientes con más del 78% de células NK CD56^{bright} en el día +30 — Pacientes con menos del 78% de células NK CD56^{bright} en el día +30 .

La probabilidad estimada de SG y SLE al año fue de 50% y 45% en los pacientes con menos del 78% de células NK CD56^{bright} en el día +30 y de 87% y 87% en aquellos con más del 78% de células NK CD56^{bright} en el día +30.

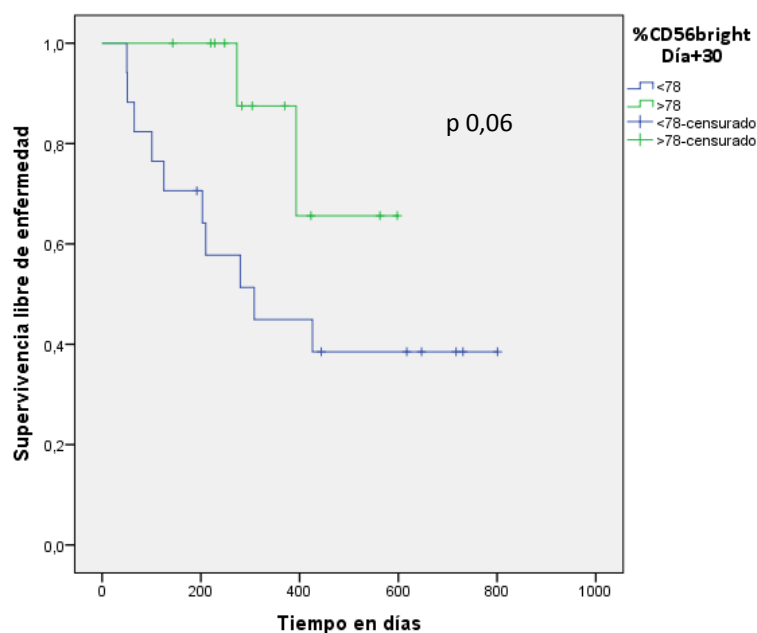


Figura 43. Curvas de supervivencia libre de enfermedad según el porcentaje de células NK con expresión intensa de CD56 (CD56^{bright}). — Pacientes con más del 78% de células NK CD56^{bright} en el día +30 — Pacientes con menos del 78% de células NK CD56^{bright} en el día +30 .

- ✓ Tendencia a mejor supervivencia global en el grupo haploidéntico de los pacientes con:
 - ✓ ALC30>300/ μ L
 - ✓ Linfocitos T CD3+ día +30 >180/ μ L
 - ✓ Linfocitos T CD4+ en el día +90 >200/ μ L
 - ✓ NK^{bright} >78% en el día +30
- ✓ Tendencia a mejor supervivencia libre de enfermedad en los pacientes con
 - ✓ ALC30>300/ μ L
 - ✓ NK^{bright} >78% en el día +30

6.5.5. Recaída.

En el análisis de recaída, en ninguna de las variables estudiadas anteriormente citadas se objetivaron puntos de corte discriminativos en las curvas ROC, por lo que no se procedió al análisis comparativo.

Discusión

7. Discusión

7.1. Recuperación linfoide T

La recuperación linfoide T en el grupo de trasplante haploidéntico fue en nuestros pacientes significativamente peor que en el grupo de trasplante familiar HLA idéntico en el primer mes postrasplante. Todas las subpoblaciones analizadas, recuentos totales de linfocitos T CD3+, linfocitos T CD4+ o colaboradores, linfocitos T CD8+ o citotóxicos, linfocitos citotóxicos diferenciados con expresión de CD57+(CD3CD8+CD57+), linfocitos T activados (CD38+HLADR+), linfocitos T naïve (CD45Ra high CD62L+ o CD27+) y memoria (CD45Ro+), linfocitos T de origen tímico temprano (CD45Ra highCD31+), y linfocitos T reguladores (CD4+CD25+CD127+débil/negativo), mostraron recuentos menores en el día +30 en el grupo haploidéntico frente al grupo control. Esta recuperación linfoide T retrasada fue especialmente marcada para los linfocitos T CD4+, que mantuvieron diferencias estadísticamente significativas con el grupo control hasta el día +90. Los linfocitos T CD4+ no sobrepasaron los 200/ μ L en el grupo haploidéntico hasta el día +180 (6 meses), mientras que esa cifra había sido alcanzada ya por el grupo control en el día +30 (1 mes). Al final del seguimiento, al año postrasplante, los recuentos de CD4+ del grupo control eran normales, pero el grupo de trasplante haploidéntico aun presentaba una mediana por debajo del límite inferior de la normalidad (<400 CD4+/ μ L). Esta recuperación de CD4+ subóptima en el trasplante haploidéntico no manipulado con ciclofosfamida postrasplante coincide con lo comunicado por el grupo del Hospital John Hopkins (84) y del Hospital MD Anderson (87), que postulan que la recuperación linfoide T en este tipo de trasplante sería más parecida a la de un trasplante de donante no emparentado. La peor reconstitución CD4+ en los primeros meses condiciona probablemente la alta tasa de reactivación CMV y de cistitis hemorrágica de origen viral que aparecen en este tipo de trasplante.

Los linfocitos T CD8+, aunque también estaban muy comprometidos en el grupo haploidéntico en el primer mes, mostraron una recuperación mejor. A los 3 meses, ya no se observaban diferencias significativas con el grupo control, y a partir de ese punto aumentaron dramáticamente, alcanzando niveles normales mucho más precozmente, a los 6 meses postrasplante.

Estas observaciones sobre las subpoblaciones T CD4+ y CD8+ son también muy similares a lo publicado por el grupo Chino sobre el modelo de trasplante haploidéntico no manipulado según protocolo GIAC(80), con una estrategia de inmunosupresión postrasplante basada en fármacos linfotóxicos como la gammaglobulina antitimocítica en vez de la ciclofosfamida postrasplante.

En el trasplante haploidéntico no manipulado, para evitar que aparezcan excesivas tasas de EICR y de rechazo es necesario administrar una profilaxis que incluya una intensa inmunosupresión T que sobrepase las barreras de la alta disparidad HLA. Independientemente de la modalidad utilizada, ya sea ciclofosfamida postrasplante o gammaglobulina antitimocítica, esto condiciona una reconstitución inmune T retrasada. Dichas estrategias de inmunosupresión afectan fundamentalmente a los linfocitos T CD4+ debido a que estos, además, son muy dependientes de la actividad tímica para su reconstitución. Los linfocitos T CD8+, sin embargo, que fundamentalmente se reconstituyen en base a la proliferación homeostática del compartimento periférico infundido con el producto de trasplante, son capaces de iniciar antes la recuperación a pesar de los protocolos de inmunosupresión. Lo hacen fundamentalmente a expensas de la expansión de linfocitos de memoria, y mantienen una buena reconstitución sobre todo a partir del tercer mes postrasplante.

La cinética de recuperación en el trasplante haploidéntico, aunque retrasada, es similar a la que se observa en los trasplantes convencionales en cuanto a la distribución de subpoblaciones T CD4+ y CD8+ en los primeros 6 meses. En este periodo se objetiva

un cociente CD4+/CD8+ invertido, debido a que la recuperación inicial de los linfocitos T CD8+ de memoria es mucho más rápida que la de los CD4+.

Reconstitución timo-dependiente. Subpoblaciones naïve y memoria.

En cuanto a las subpoblaciones T naïve y memoria, la reconstitución inmune en el grupo haploidéntico fue, igual a lo descrito en la literatura en los trasplantes convencionales, a base fundamentalmente de linfocitos de memoria (65) durante los primeros 6 meses. A partir del día +180 se observó una aparición progresiva de la reconstitución timo-dependiente con aumento de la cantidad de linfocitos naïve (CD45Rahigh) y de origen tímico temprano (CD45RahighCD31+).

En cuanto a la comparación directa con el grupo control, en el día +30 los linfocitos T CD4+ y CD8+, tanto naïve como de memoria fueron menores en el grupo haploidéntico, de forma paralela a los linfocitos T totales. Posteriormente, los linfocitos T de memoria se reconstituyeron de forma similar en ambos grupos en todos los puntos de estudio, y sin embargo, los linfocitos T naïve y de origen tímico temprano se reconstituyeron en el grupo haploidéntico peor que en el grupo control en los primeros 6 meses. Estos datos son concordantes con lo comunicado por el grupo de MDAnderson en 2012 (87). Dentro de los linfocitos T naïve y de origen tímico temprano, la subpoblación T CD4+ naïve y tímica fue significativamente peor en el día +90 y +180 en el grupo haploidéntico, y a partir de este punto inició una recuperación significativa con recuentos similares en ambos grupos al año postrasplante. Los linfocitos CD8+ naïve y de origen tímico temprano, sin embargo, se reconstituyeron más rápidamente en el grupo haploidéntico sin presentar ya diferencias significativas con el grupo control a partir del día +90 hasta el final del seguimiento.

En conclusión, el perfil de reconstitución tras un trasplante haploidéntico es similar al del trasplante HLA idéntico convencional, con una reconstitución en base a células linfoides de memoria que provienen de la proliferación periférica de los linfocitos infundidos con

el trasplante durante los primeros 6 meses, con posterior inicio de la recuperación linfoide timo-dependiente. Aunque con una recuperación de origen tímico algo retrasada en comparación al trasplante HLA idéntico convencional en posible relación con una inmunosupresión más intensa durante el acondicionamiento, estos hallazgos demuestran que no existe un daño tímico relevante o limitante en el trasplante haploidéntico no manipulado con ciclofosfamida postrasplante, ya que los pacientes mantienen una adecuada recuperación linfoide naïve y de origen tímico a partir del día +180. Al igual que para los linfocitos T totales la reconstitución naïve y tímica de la subpoblación CD8+ fue mejor y más rápida que la de la subpoblación CD4+. La constatación de una adecuada reconstitución linfoide timo-dependiente es de gran relevancia en la recuperación inmune postrasplante a largo plazo.

Carecemos de datos publicados sobre la recuperación linfoide timo-dependiente en el trasplante haploidéntico no manipulado con otras estrategias de profilaxis de EICR como el uso de ATG (Protocolo GIAC), que producen mayor daño tímico que la ciclofosfamida postrasplante (112).

Linfocitos citotóxicos diferenciados con expresión de CD57+

Los linfocitos T CD8+ con actividad citotóxica y expresión de CD57+, de forma coherente a lo que se observó con los linfocitos T CD8 en general, tuvieron muy buena recuperación en el grupo haploidéntico desde el día +90 (3 meses), en que ya fueron similares al grupo control.

Aquellos con expresión de CD28+, lo que traduce un reconocimiento alorreactivo, fueron significativamente menos frecuentes en el grupo haploidéntico en el día +30 y +90 y posteriormente, tras un aumento rápido, fueron iguales a los encontrados en el grupo control en el día +180 y los superaron en el +360. La cinética de estos linfocitos en el grupo control de trasplante familiar HLA idéntico fue diferente, ya que aumentaron solo en los primeros 3 meses y luego se objetivó una disminución progresiva de estos. Los

linfocitos T CD3+CD8+CD57+ CD28 negativos (51,52), de perfil supresor o regulador, sin embargo, siguieron una cinética paralela en ambos grupos y fueron similares desde el día +90. Esta diferencia radica probablemente en que en el trasplante haploidéntico la ciclofosfamida postrasplante es capaz de eliminar estos linfocitos alorreactivos CD28+ (41) durante los primeros meses postrasplante, produciéndose luego una recuperación de esta capacidad y una mayor expresión de activación o aloreactividad a medio y largo plazo debida a la diferencia HLA. En el trasplante HLA idéntico, por el contrario, estos linfocitos CD28+ son más frecuentes en las primeras fases de reconocimiento alorreactivo y posteriormente disminuyen o se estabilizan.

De forma opuesta a nuestros hallazgos, (80) en el trasplante haploidéntico no manipulado según el protocolo GIAC, los investigadores encuentran mayor expresión de CD28+ en linfocitos T CD8+ en los puntos +30 y +90 en el trasplante haploidéntico frente a un grupo control, igualándose a partir de este punto, ya que la profilaxis de EICR de este protocolo incluye fármacos con potente actividad antilinfocítica que no eliminan selectivamente los linfocitos alorreactivos como lo hace la ciclofosfamida postrasplante.

De este modo, nuestro estudio evidencia en el contexto clínico del propio paciente que el uso de ciclofosfamida postrasplante efectivamente disminuye selectivamente los linfocitos alorreactivos in vivo, permitiendo las bajas tasas de EICR aguda características de este tipo de profilaxis en el trasplante haploidéntico no manipulado.

Linfocitos T activados CD38+ HLADR+

Analizando los linfocitos T CD4+ y CD8+ activados según la expresión de HLADR y CD38, no se objetivaron diferencias significativas con el grupo control en ninguno de los puntos analizados. Tanto la buena recuperación de linfocitos T con actividad citotóxica CD3+CD8+CD57+ como la presencia de linfocitos T activados a partir de los 3 meses postrasplante pueden ser marcadores de una adecuada capacidad de respuesta inmune

en los pacientes sometidos a un trasplante haploidéntico, a pesar de la limitación que supone una recuperación de linfocitos T CD4+ retrasada.

Linfocitos T reguladores CD4+ CD25+ CD127+débil/negativo

En el análisis, llama la atención que a pesar de que los linfocitos T CD4+ totales son significativamente menores al mes y a los 3 meses postrasplante y se mantienen en niveles moderadamente más bajos durante todo el periodo de seguimiento en el grupo de trasplante haploidéntico, los linfocitos T reguladores ya son similares en ambos grupos a partir del día +90. La buena recuperación de esta subpoblación linfoide T contribuye a explicar las aceptables tasas de EICR en este tipo de trasplante a pesar de la elevada disparidad HLA del mismo, ya que los linfocitos T reguladores juegan un importante papel en el control de esta complicación aloreactiva (15).

De nuevo, con este hallazgo, nuestro estudio evidencia por primera vez in vivo en el paciente la actividad selectiva de la ciclofosfamida postrasplante, que como se sugiere en modelos murinos respeta esta subpoblación linfoide T reguladora(113), lo que constituye parte muy importante de su efecto protector frente a la EICR.

Así mismo, la buena reconstitución de linfocitos T reguladores es otra expresión de que en este tipo de trasplante esta preservada la capacidad funcional tímica.

7.2. Recuperación linfoide B.

La recuperación linfoide B fue lenta en ambos grupos y similar a lo descrito en la literatura en los trasplantes convencionales (65,70). En el primer mes los recuentos de linfocitos B fueron peores en el grupo haploidéntico con p significativa, por efecto de la ciclofosfamida postrasplante sobre esta población. Sin embargo, posteriormente se inició una paulatina recuperación y los pacientes con trasplante haploidéntico estudiados alcanzaron recuentos normales aproximadamente a los 6 meses postrasplante. La recuperación fue a base prácticamente en su totalidad de linfocitos B naïve, y solo a partir del año postrasplante aparecieron linfocitos B de memoria. Es de

reseñar que los pacientes del grupo control no habían alcanzado recuentos normales de linfocitos B al final del seguimiento un año postrasplante.

De forma paralela, en el trasplante haploidéntico se produjo una adecuada recuperación de las inmunoglobulinas séricas a partir de los 6 meses. La inmunoglobulina de tipo IgM fue la primera en alcanzar niveles normales, seguida por la IgG, que fue normal al final del primer año. La IgA no se había recuperado al final del seguimiento en el día +360. La secuencia y cinética de recuperación de las inmunoglobulinas en el grupo de trasplante haploidéntico fue igual a la esperada en los trasplantes convencionales, en el que la IgM se normaliza entre 2 y 6 meses, la IgG entre 3 y 18 meses y la IgA entre 1 y 3 años (65). No fue peor en ningún punto que la del grupo control de trasplante HLA idéntico, de hecho, los niveles de inmunoglobulinas fueron mejores en el grupo haploidéntico a partir de los 6 meses que en el grupo control.

Para interpretar correctamente estos resultados, habría que considerar que la peor reconstitución linfoide B a medio y largo plazo de nuestro grupo control frente al grupo de trasplante haploidéntico puede estar en relación a una mayor proporción de pacientes con linfomas B y tratamiento previo con rituximab en este grupo (37.5% vs 16.6%), tal como se describe en la literatura (114). Aun así, lo que sí se puede concluir es que tanto la recuperación linfoide B como la producción de anticuerpos tras un trasplante haploidéntico es adecuada y por lo tanto va a permitir realizar estrategias de vacunación postrasplante en los mismos momentos en los que normalmente se aplican en un trasplante HLA idéntico convencional. Al igual que para un trasplante convencional, la cinética de reconstitución linfoide B tras un trasplante haploidéntico con ciclofosfamida postrasplante recuerda la normal ontogenia de la linfopoyesis B. Estos hallazgos son consistentes con lo observado por Chang y cols. (80), que tampoco encuentran diferencias en la reconstitución inmune B con el trasplante haploidéntico según el protocolo GIAC frente al trasplante convencional.

7.3. Reconstitución NK

La subpoblación de linfocitos NK es la población que primero se reconstituye tras un Alo-TPH (65). De forma similar a los que se recoge en la literatura, nuestro grupo control de trasplante familiar HLA idéntico ya había recuperado las cifras normales en el día+30. El grupo de trasplante haploidéntico, sin embargo, requirió llegar al día +60 para alcanzar una mediana que correspondiera a los recuentos normales de células NK, si bien en el día +30 hasta un 45% de los pacientes ya habían alcanzado cifras de células NK superiores al límite inferior de la normalidad. Aun así, es de reseñar que entre todas las poblaciones linfoides estudiadas, la población NK es sin duda la que mostró en el estudio una mejor reconstitución en el grupo haploidéntico y menores diferencias en lo que se refiere a recuentos totales con el grupo control.

La reconstitución NK se inicia en todos los tipos de trasplante con un aumento del porcentaje de los linfocitos NK inmaduros con expresión de CD56intensa (CD56^{bright}) y NKG2A positivos, que en condiciones normales suponen aproximadamente un 10%. Así, en ambos grupo se detectaba en el día +15 en torno a un 20% de células NK inmaduras. En el grupo de trasplante familiar HLA idéntico el porcentaje de estas células inmaduras se mantuvo o disminuyó ligeramente a partir de este punto de seguimiento, pero en el grupo de trasplante haploidéntico el porcentaje de células NK inmaduras y de forma paralela la expresión de NKG2A continuó aumentando significativamente hasta el día +30 en que se alcanzaron porcentajes de más del 80% en algunos casos, con posterior disminución. El porcentaje de células NK inmaduras tanto por la expresión de CD56^{bright} como por la de NKG2A fue significativamente superior en el grupo de trasplante haploidéntico frente al control en todos los puntos estudiados a partir del día +30 (+30, +60, +90), lo que claramente refleja que en este tipo de trasplante la maduración NK se encuentra retrasada con respecto a los trasplantes convencionales. Estos datos de reconstitución NK coinciden con los expuestos por el grupo Chino que realiza el trasplante haploidéntico no manipulado según protocolo GIAC (83). No

podemos sacar conclusiones sobre si este efecto de retraso en la maduración NK en nuestro estudio se debe a las diferencias HLA entre donante y receptor o a la modalidad de profilaxis de EICR con ciclofosfamida postrasplante, si bien el que este hallazgo también aparezca en el protocolo del grupo Chino que utiliza otra modalidad diferente de profilaxis podría llevarnos a pensar que la diferencia HLA es la que juega un papel más importante. Esto podría tener su explicación en que la maduración y educación de las células NK se produce en condiciones normales por contacto de sus receptores KIR de tipo inhibitorio con las células estromales de medula ósea a través de sus ligandos HLA; en el caso de un trasplante haploideéntico el contacto debe producirse entre las células NK del donante y las células estromales del receptor, con una elevada diferencia antigénica.

Al igual que Chang y cols. (83), y en contra de estudios previos (111) que propugnaban que las células NK inmaduras que aparecen en el trasplante haploideéntico no tenían una capacidad citotóxica adecuada, en nuestro estudio la expresión de los receptores activatorios citotóxicos NKp30 y NKp46 era similar en ambos grupos a partir del día +30. La expresión del receptor inhibitorio NKG2D, relacionado con respuesta antitumoral (92) tampoco mostro diferencias significativas entre ambos grupos. Todo ello, aunque sin disponer de ensayos funcionales que serían necesarios para confirmarlo, apoya la hipótesis de que las células NK tras un trasplante haploideéntico conservan su capacidad funcional a pesar de presentar un perfil de maduración más lento.

Sin embargo, dadas las cada vez más frecuentes publicaciones que apoyan la relevancia de la aloreactividad NK en el control de la enfermedad en el campo del trasplante haploideéntico (115), la observación de que la maduración NK está retrasada en esta modalidad de trasplante, hace atractiva la idea de reforzar la aloreactividad NK en estos momentos iniciales postrasplante haploideéntico con alguna estrategia basada en inmunoterapia adoptiva (116,117).

Es de reseñar que hasta la fecha no existen publicaciones sobre las características de la reconstitución NK en el trasplante haploidéntico no manipulado con ciclofosfamida postrasplante.

7.4. Reconstitución inmune y Enfermedad injerto contra Receptor en el trasplante haploidéntico.

Es conocida la relación existente entre EICR aguda y crónica y reconstitución inmune (59,62), y que la presencia de EICR puede empeorar la reconstitución inmune postrasplante a medio y largo plazo, tanto por sí misma como por los tratamientos inmunosupresores que requiere para su control. En el contexto del trasplante haploidéntico no manipulado según protocolo GIAC, el grupo de Chang y cols. (83) observó que la cantidad total de linfocitos T CD3+/microlitro y el ratio T/NK en el día +14 eran predictores de EICR aguda, de forma que aquellos pacientes con más linfocitos T y menos NK de forma precoz tenían más posibilidades de desarrollar esta complicación (83). En nuestro estudio, no fue posible realizar un análisis multivariante para valorar las variables predictoras de EICR relacionadas con la reconstitución inmune, por no tener suficiente tamaño muestral. En análisis comparativo directo, la reconstitución inmune precoz en el día +15 (linfocitos T y NK totales y ratio T/NK), no presentaba diferencias significativas entre los pacientes con y sin EICR aguda. A pesar de algunas tendencias, tampoco se objetivaron diferencias significativas en la reconstitución inmune T al mes y a los 3 meses postrasplante. Estas diferencias entre nuestras observaciones y las del grupo chino se pueden explicar por la diferente estrategia de profilaxis de la EICR, ya que en el protocolo GIAC la profilaxis se realiza con potentes fármacos inmunosupresores que disminuyen los linfocitos T de forma no selectiva en las fases precoces. La ciclofosfamida postrasplante, por el contrario, produce una eliminación dirigida de los linfocitos T alorreactivos, de modo que la población linfoide presente en fases tempranas está compuesta fundamentalmente por linfocitos T que teóricamente

no producirían EICR. A los 6 meses, sin embargo, sí tuvieron peores recuentos linfoides T totales, CD4+ y CD8+ aquellos pacientes que habían desarrollado EICR aguda. La reconstitución inmune T en nuestro grupo, por lo tanto, fue muy similar en términos generales en los primeros 3 meses en los pacientes con y sin EICR aguda, y sin embargo, se vio afectada negativamente a partir de los 6 meses (cuando se inicia la reconstitución inmune timo-dependiente) en los pacientes con EICR aguda activa. Este deterioro de la reconstitución inmune T a medio plazo en los pacientes con EICR aguda es probablemente secundaria al daño inducido tanto por la propia patología como por los tratamientos necesarios para controlarla. Es de reseñar que los linfocitos T con expresión de marcadores de activación si fueron significativamente mejores en el grupo de pacientes sin EICR aguda, lo que puede significar que en estas fases precoces, a pesar de una reconstitución similar, los pacientes sin EICR aguda tienen mejor funcionalidad y capacidad de activación linfocitoide T.

La reconstitución inmune de origen tímico, en cuanto a presencia de células T de fenotipo naïve (CD45Rah CD62L+ o CD27+) y de origen tímico temprano (CD45Ra+ CD31+) también fue afectada negativamente por la presencia de EICR aguda activa al mes y a los 3 meses, especialmente en lo que respecta a los linfocitos T CD4+ naïve, que fueron significativamente menores en estos puntos en los pacientes con EICR aguda frente a los que no habían desarrollado esta complicación. A los 6 meses la reconstitución de linfocitos T CD4+ naïve y tímicos también era peor en los pacientes con EICR, aunque no se pudiera alcanzar una p significativa. La interrelación entre la EICR y la reconstitución inmune es bidireccional en el trasplante de progenitores hemopoyéticos. Es conocido que los defectos de funcionalidad tímica predisponen al desarrollo de EICR (16,74) en los trasplantes convencionales, y del mismo modo, también es un hecho contrastado que la presencia de EICR activa produce daño tímico (60,62). Nuestros hallazgos serían consistentes con la idea de que este fenómeno también ocurre en el contexto del trasplante haploidéntico no manipulado, de modo que

aquellos pacientes con pobre reconstitución de origen tímico tendrían mayor riesgo para el desarrollo de EICR, como demuestra la peor reconstitución de origen tímico temprana (+30) de los pacientes con esta complicación, y la misma patología ejercería una influencia negativa en la funcionalidad del timo en fases posteriores (+90,+180).

Los linfocitos T reguladores (CD4+CD25+CD127+débil/-), que juegan un papel fundamental en el control inflamatorio de la EICR aguda (15,118), tuvieron mejores recuentos precoces (en el día +30) en los pacientes que no desarrollaron EICR aguda, con significación estadística. Esto nos sugiere que, en el contexto del trasplante haploidéntico no manipulado, tener una mejor reconstitución inicial de linfocitos T reguladores podría prevenir el desarrollo de esta complicación. Dicha observación apoya la instauración de protocolos de infusión de linfocitos T reguladores de forma precoz en este tipo de trasplante (34), si bien no serían de utilidad en fases posteriores dada la buena recuperación de esta subpoblación en el grupo haploidéntico a partir del día +90.

La reconstitución NK a nivel global fue peor en los pacientes que desarrollaron EICR aguda, con peores recuentos totales en el día +30 y +60, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. Adicionalmente, en cuanto a la maduración de esta subpoblación, los pacientes con EICR aguda tuvieron mayor proporción de células inmaduras CD56^{bright} y NKG2A+ en todos los puntos estudiados (+30, +60 y +90), con p significativa en los 2 últimos. Estos datos apoyan todas las recientes publicaciones que sugieren que la población NK tiene un importante papel en el control de la EICR (89), a través de múltiples mecanismos. Probablemente, la interrelación entre la reconstitución NK y la EICR es doble, de forma que aquellos pacientes con peor reconstitución NK tanto en términos de recuentos totales como en capacidad de maduración van a tener más probabilidades de desarrollar EICR y esta misma patología y los tratamientos que conlleva van a deteriorar así mismo la capacidad de recuperación de esta población

linfoide. Este hallazgo coincide con lo publicado por Chang y cols.(83) en el contexto del protocolo GIAC, con una diferente estrategia de profilaxis de la EICR.

Como ya se ha expuesto, estas diferencias entre la reconstitución inmune de los pacientes que desarrollan EICR aguda y aquellos que no lo desarrollan ponen en evidencia posibles interrelaciones a explorar y que podrían derivar en una mejor predicción de la aparición de esta complicación en un paciente sometido a un trasplante haploidéntico no manipulado. Así mismo, abren perspectivas para la detección de posibles dianas para intervenciones terapéuticas frente a la EICR como la infusión de células T reguladoras (34,118) o de células NK.

7.5. Reconstitución inmune y Citomegalovirus en el trasplante haploidéntico.

No se encontraron diferencias relevantes en la reconstitución inmune de los pacientes sometidos a trasplante haploidéntico que desarrollaron CMV y los que no lo hicieron. De forma fisiológica, en respuesta a la presencia de reactivación de CMV los pacientes sometidos a trasplante haploidéntico fueron capaces de aumentar los linfocitos T CD8+ totales y los linfocitos citotóxicos diferenciados con expresión de CD57+, que fueron significativamente mayores a los 3 y 6 meses en los pacientes con CMV frente a los que no habían reactivado. Este hallazgo es concordante con estudios previos que demuestran una capacidad conservada de respuesta inmune específica anti CMV en esta modalidad de trasplante haploidéntico (84).

La reactivación de CMV es una complicación frecuente en el trasplante haploidéntico con ciclofosfamida postrasplante, debido a su reconstitución inmune T retrasada, sin embargo, las reactivaciones son bien controladas con tratamiento antiviral y raramente son causa de mortalidad en estos pacientes, probablemente gracias a la capacidad de respuesta inmune específica que conservan ante el estímulo de la reactivación.

7.6. Reconstitución inmune y supervivencia en el trasplante haploidéntico.

En cuanto a la influencia de la reconstitución inmune precoz en la supervivencia, tanto el grupo de la universidad de Pekin (81,82) como el grupo de Baltimore (85) han demostrado la importancia pronóstica del ALC30 (recuento linfocitario absoluto en el día +30) en el trasplante haploidéntico no manipulado. El grupo Chino observó que los pacientes con $ALC30 > 300/\mu L$ tenían menos recaídas, menor mortalidad infecciosa, mejor supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad, y menos mortalidad no relacionada con la recaída. El grupo del Hospital Johns Hopkins comunicó en el congreso de la Sociedad Americana de Hematología que tener ALC30 mayor de $200/\mu L$ predecía mejor supervivencia global y libre de enfermedad en sus pacientes. Nuestro estudio está realizado en el contexto de un protocolo de trasplante haploidéntico con algunas adaptaciones al protocolo Johns Hopkins, como el uso de sangre periférica y la sustitución de la radioterapia por busulfán. En nuestro análisis el punto más discriminativo para la relación entre el ALC30 y la supervivencia fue el de $300/\mu L$ y teniendo en cuenta este punto de corte efectivamente los pacientes por encima de estos recuentos tuvieron mejor supervivencia global y libre de enfermedad en las curvas Kaplan Meyer, si bien el tamaño muestral fue una limitación para obtener diferencias estadísticamente significativas. La mortalidad infecciosa también fue menor en aquellos pacientes con $ALC30 > 300/\mu L$. Dada la consistencia de todos los datos acumulados tanto en las diferentes publicaciones como en nuestro estudio, se puede considerar que el ALC30 o recuento linfocitario total en el día +30 es una determinación de gran utilidad para valorar el pronóstico global de supervivencia postrasplante en el contexto del trasplante haploidéntico no manipulado. Esta determinación tiene además la ventaja de poder obtenerse a través de una tecnología tan sencilla, rápida y accesible como un contador hematológico convencional. Adicionalmente, en el estudio de la relación entre la reconstitución inmune precoz postrasplante y la supervivencia, se analizaron los

Linfocitos T totales y los CD4+/μL en el día +30. Solo los Linfocitos T CD3+ totales+/μL fueron discriminativos. Los pacientes con más de 180 linfocitos T/μL en el día +30 tuvieron mejor supervivencia global (p no sig.) y menor mortalidad infecciosa. En conclusión, podemos afirmar que nuestros resultados confirman la relevancia de la reconstitución inmune precoz en la evolución clínica del trasplante haploidéntico no manipulado.

Diversos autores han demostrado que en el contexto del trasplante convencional HLA idéntico, la reconstitución inmune de linfocitos T CD4+ a medio plazo se relaciona con la supervivencia de forma independiente. Kim y cols. y Berger y cols. (75,76) demostraron que aquellos pacientes que alcanzaban recuentos de linfocitos T CD4+ mayores de 200 por microlitro a los 3 meses postrasplante tenían mejor supervivencia. Analizando la reconstitución de linfocitos T CD4+ a los 3 meses postrasplante en nuestro grupo de trasplante haploidéntico, a pesar de no obtener significación estadística debido al escaso tamaño muestral, aquellos pacientes con más de 200 Linfocitos T CD4+/μL en el día +90 tuvieron mejor tasa de supervivencia global que los que no habían alcanzado estos recuentos. La supervivencia libre de enfermedad, sin embargo, no se vio afectada por este dato. Este hallazgo apoya la afirmación de que en el trasplante haploidéntico no manipulado la reconstitución inmune T CD4+ a medio plazo también parece tener relevancia pronóstica de forma similar que en el trasplante HLA idéntico convencional.

Al analizar si la cantidad de células NK inmaduras CD56^{bright} en la reconstitución precoz postrasplante haploidéntico tenían alguna influencia en la supervivencia global y libre de enfermedad, tal como ha demostrado Chang y cols. (83) en el trasplante haploidentico con protocolo GIAC, se observó que en nuestros pacientes tanto el porcentaje de células NKCD56^{bright} como los recuentos totales de estas células en el día +15 no producían ninguna influencia sobre la supervivencia. Extendiendo el análisis hasta el día +30, en que disponíamos de mayor número de muestras, aquellos pacientes con un porcentaje

mayor de células NK CD56^{bright} (punto de corte 78%), tuvieron mejores tasas de supervivencia global ($p < 0,05$) y libre de enfermedad (p no sig) en las curvas Kaplan Meyer.

Aunque es difícil interpretar estos resultados, las células NK han demostrado tener una especial relevancia en el contexto del trasplante haploidéntico, por lo que este hallazgo puede tener su importancia. Nuestros resultados además, van en la misma dirección que los del grupo Chino de trasplante haploidéntico según protocolo GIAC, que defendía que estas células NK CD56^{bright} eran beneficiosas debido a su perfil más inmunoregulador que citotóxico.

7.7. Observaciones finales y limitaciones del estudio.

El estudio objeto de esta tesis, con la principal limitación derivada del tamaño muestral, tiene sin embargo el valor de un diseño prospectivo con una cohorte de control simultánea que permite una comparación directa sin los factores de confusión derivados del uso de cohortes históricas en el campo del trasplante, en que la evolución clínica de los pacientes mejora en gran medida en relación a las décadas y la experiencia de los centros trasplantadores. Además constituye la primera evidencia publicada sobre la reconstitución inmune en el trasplante haploidéntico no manipulado con ciclofosfamida postrasplante con sangre periférica como fuente de progenitores y acondicionamiento basado en busulfan. De hecho, dada la reciente implantación en la práctica habitual del trasplante haploidéntico no manipulado, aún son escasas las publicaciones sobre reconstitución inmune en el contexto de otros protocolos similares. El estudio pone en evidencia diferencias sustanciales en la reconstitución inmune de este tipo de trasplante frente al trasplante HLA idéntico convencional que proporcionan una base para explicar sus peculiaridades clínicas como la escasa incidencia de EICR y las mayores tasas de reactivaciones CMV y otras complicaciones infecciosas. A su vez constata que a pesar

de la intensa inmunosupresión que es necesaria para superar las barreras de la diferencia HLA inherentes al trasplante haploidéntico, la estrategia de profilaxis de la EICR basada en ciclofosfamida postrasplante permite una reconstitución inmune suficiente a medio y largo plazo, aunque ligeramente retrasada en los estadios iniciales, y que es responsable en parte del buen resultado clínico de este tipo de trasplante.

Las diferencias objetivadas abren también posibilidades de explorar los resultados del uso de diferentes modalidades de terapia celular para mejorar los aspectos más comprometidos, como por ejemplo la infusión precoz de células NK cuya maduración está retrasada, o el uso de interleucinas estimulantes de la reconstitución inmune T (IL7, IL15) en fases muy precoces (57).

La infusión de linfocitos T reguladores, que se ha propugnado para mejorar la evolución clínica en los trasplantes haploidénticos manipulados o seleccionados (33), sería menos necesaria en el trasplante haploidentico no manipulado con ciclofosfamida postrasplante, ya que esta estrategia de inmunosupresión preserva la reconstitución de esta subpoblación T como se demuestra en nuestros pacientes. Únicamente podrían jugar un papel en las fases más precoces, si se confirma nuestra observación de que aquellos pacientes con peor reconstitución de linfocitos T reguladores en el primer mes van a presentar más EICR aguda.

Así mismo, el valor de la infusión de linfocitos T específicos anti-CMV sería discutible. Por una parte la elevada tasa de reactivaciones CMV de este tipo de trasplante y su recuperación de linfocitos T CD4+ retrasada hacen pensar que su uso podría ser beneficioso en este tipo de trasplante. Sin embargo, la capacidad de reacción de los linfocitos T citotóxicos CD8+ ante la reactivación que se observa en el estudio y la adecuada respuesta de los pacientes a los tratamientos antivirales no apoyaría su uso profiláctico, si bien podría ser de utilidad su uso terapéutico en los pacientes con mayor número de reactivaciones o peor control de estas.

En cuanto a las limitaciones del estudio para detectar estas diferencias, la principal es el escaso tamaño muestral alcanzado, especialmente en el grupo control, lo que disminuye su potencia estadística.

En cuanto al impacto de la reconstitución inmune en los resultados clínicos del trasplante, fundamentalmente en la EICR y la supervivencia, el análisis se ha visto limitado igualmente por el tamaño muestral, la mediana de seguimiento y la imposibilidad de realizar un análisis multivariante para evitar variables de confusión. Sin embargo el estudio señala en el análisis univariante y en las curvas de supervivencia posibles variables con influencia clínica relevante como los factores de reconstitución inmune precoz, ALC30, linfocitos T reguladores, etc, que deben ser explorados y contrastados con mayor número de pacientes. Estos hallazgos presentan además el valor añadido de confirmar observaciones previas de otros grupos en el ámbito del trasplante haploidéntico no manipulado, y constituyen una fuente atractiva para futuras investigaciones en este campo.

Conclusiones

8. Conclusiones

- Se podría afirmar en general, que la reconstitución inmune tras un trasplante haploidéntico no manipulado con altas dosis de ciclofosfamida postrasplante es suficiente y permite una buena evolución clínica de los pacientes.
- La reconstitución inmune en el primer mes postrasplante es peor en este grupo de trasplante haploidéntico no manipulado que en el de trasplante familiar HLA idéntico sobre todo en lo que respecta a las poblaciones linfoides T. A partir de este punto, la reconstitución de los linfocitos T CD8+ o citotóxicos en el trasplante haploidéntico es buena y muy similar a la del trasplante HLA idéntico, mientras que la recuperación de los linfocitos T CD4+ está retrasada en el primer año, lo que puede condicionar las altas tasas de reactivación CMV y cistitis hemorrágica de origen viral que se describen en este tipo de trasplante.
- La funcionalidad del timo después de este protocolo de trasplante haploidéntico no manipulado está conservada, y la reconstitución naïve y de origen tímico aparece de forma adecuada a partir de los 6 meses postrasplante.
- Los linfocitos T reguladores, al contrario que el resto de subpoblaciones T CD4+, muestran una excelente recuperación en este protocolo de trasplante haploidéntico no manipulado. Esto contribuye a explicar la baja incidencia de EICR en este tipo de trasplante a pesar de la amplia diferencia HLA y su presencia es parte del efecto protector frente al EICR de la ciclofosfamida postrasplante.
- La reconstitución B tanto en términos de recuentos linfocitarios, maduración y niveles séricos de inmunoglobulinas en este protocolo de trasplante haploidéntico, es adecuada y similar a la del trasplante HLA idéntico familiar.
- La población NK es la que más rápidamente se reconstituye en este protocolo de trasplante haploidéntico, con una recuperación muy precoz de los recuentos normales. Sin embargo, la maduración NK se encuentra retrasada en los

primeros 3 meses respecto al trasplante familiar idéntico, aunque con expresión conservada de receptores activadores e inhibidores no KIR.

- En aquellos pacientes con EICR aguda destaca una peor reconstitución de origen tímico, peor recuperación precoz de linfocitos T reguladores, y una maduración NK más retrasada.
- Los pacientes sometidos a este protocolo de trasplante haploidéntico no manipulado con ciclofosfamida postrasplante conservan la capacidad de respuesta de los linfocitos T CD8+ con expresión de marcadores citotóxicos CD57+ ante una reactivación del citomegalovirus.
- En el grupo de trasplante haploidéntico no manipulado, aquellos pacientes con mejor reconstitución inmune precoz en términos de “recuento linfocitario total” en el día +30 (ALC30), tienen tendencia a una mejor supervivencia global, libre de enfermedad y menor mortalidad infecciosa, lo que confirma la utilidad clínica de esta determinación.

Bibliografía

9. Bibliografía

1. Appelbaum FR, Forman SJ, Negrin RS, Blume KG. Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation. 4th Edition. Wiley-Blackwell; 2011. 1756 p.
2. Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*. 12 de septiembre de 1957;257(11):491-6.
3. Mathe G, Jammet H, Pendic B, Schwarzenberg L, Duplan JF, Maupin B, et al. [Transfusions and grafts of homologous bone marrow in humans after accidental high dosage irradiation]. *Rev Fr Études Clin Biol*. marzo de 1959;4(3):226-38.
4. Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. *Cancer Res*. octubre de 1965;25(9):1525-31.
5. Kessinger A, Smith DM, Strandjord SE, Landmark JD, Dooley DC, Law P, et al. Allogeneic transplantation of blood-derived, T cell-depleted hemopoietic stem cells after myeloablative treatment in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant*. noviembre de 1989;4(6):643-6.
6. Gratwohl A, Baldomero H, Frauendorfer K, Urbano-Ispizua A, Niederwieser D, Joint Accreditation Committee of the International Society for Cellular Therapy ISCT, et al. Results of the EBMT activity survey 2005 on haematopoietic stem cell transplantation: focus on increasing use of unrelated donors. *Bone Marrow Transplant*. enero de 2007;39(2):71-87.
7. Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM, Chapuis B, Chopra R, Cornelissen JJ, et al. Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. *Blood*. 2000;95(12):3702-9.
8. Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, Clift R, Forman SJ, Negrin R, et al. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med*. 2001;344(3):175-81.
9. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 26 de octubre de 1989;321(17):1174-8.
10. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. *N Engl J Med*. 1997;337(6):373-81.
11. Rocha V. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood*. 15 de mayo de 2001;97(10):2962-71.
12. Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood*. 1998;91(3):756-63.

13. Giralt S, Estey E, Albitar M, van Besien K, Rondón G, Anderlini P, et al. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood*. 15 de junio de 1997;89(12):4531-6.
14. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant*. diciembre de 2005;11(12):945-56.
15. Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4⁺ CD25⁺ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood*. 2002;99(10):3493-9.
16. Flowers MED, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem H-P, Petersdorf EW, et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood*. 17 de marzo de 2011;117(11):3214-9.
17. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. octubre de 1974;18(4):295-304.
18. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant*. junio de 1995;15(6):825-8.
19. Shimabukuro-Vornhagen A, Hallek MJ, Storb RF, von Bergwelt-Baildon MS. The role of B cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Blood*. 3 de diciembre de 2009;114(24):4919-27.
20. Pidala J, Lee SJ, Ahn KW, Spellman S, Wang H-L, Aljurf M, et al. Nonpermissive HLA-DPB1 mismatch increases mortality after myeloablative unrelated allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 16 de octubre de 2014;124(16):2596-606.
21. Isgrò A, Marziali M, Sodani P, Gaziev J, Erer B, Polchi P, et al. Immunohematologic reconstitution in pediatric patients after T cell-depleted HLA-haploidentical stem cell transplantation for thalassemia. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. noviembre de 2010;16(11):1557-66.
22. Rizzieri DA, Koh LP, Long GD, Gasparetto C, Sullivan KM, Horwitz M, et al. Partially Matched, Nonmyeloablative Allogeneic Transplantation: Clinical Outcomes and Immune Reconstitution. *J Clin Oncol*. 20 de febrero de 2007;25(6):690-7.
23. Luznik L, Bolanos-Meade J, Zahurak M, Chen AR, Smith BD, Brodsky R, et al. High-dose cyclophosphamide as single-agent, short-course prophylaxis of graft-versus-host disease. *Blood*. 22 de abril de 2010;115(16):3224-30.
24. Deeg HJ. How I treat refractory acute GVHD. *Blood*. 15 de mayo de 2007;109(10):4119-26.
25. Carpenter PA, Kitko CL, Elad S, Flowers MED, Gea-Banacloche JC, Halter JP, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: V. The 2014 Ancillary Therapy and Supportive Care Working

- Group Report. Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant. julio de 2015;21(7):1167-87.
26. J. Apperley, E. Carreras, Gluckman E, A. Gratwohl, Masszi T. ESH-EBMT Handbook on Haematopoietic Stem Cell Transplantation (2008) | ESH - European School of Haematology [Internet]. 5a edition. European School of hematology; 2008. Recuperado a partir de: <http://www.esh.org/esh-ebmt-handbook-on-haematopoietic-stem-cell-transplantation-2008/>
 27. Petersdorf EW. Limits of HLA mismatching in unrelated hematopoietic cell transplantation. Blood. 1 de noviembre de 2004;104(9):2976-80.
 28. Arora M, Weisdorf DJ, Spellman SR, Haagenson MD, Klein JP, Hurley CK, et al. HLA-Identical Sibling Compared With 8/8 Matched and Mismatched Unrelated Donor Bone Marrow Transplant for Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia. J Clin Oncol. 23 de febrero de 2009;27(10):1644-52.
 29. Tiercy J-M. Unrelated Hematopoietic Stem Cell Donor Matching Probability and Search Algorithm. Bone Marrow Res. 2012;2012:1-8.
 30. Dupont B, O'Reilly RJ, Pollack MS, Good RA. Use of HLA genotypically different donors in bone marrow transplantation. Transplant Proc. marzo de 1979;11(1):219-24.
 31. Aversa F, Tabilio A, Terenzi A, Velardi A, Falzetti F, Giannoni C, et al. Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical« three-loci» incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. Blood. 1994;84(11):3948-55.
 32. Aversa F. Full Haplotype-Mismatched Hematopoietic Stem-Cell Transplantation: A Phase II Study in Patients With Acute Leukemia at High Risk of Relapse. J Clin Oncol. 20 de mayo de 2005;23(15):3447-54.
 33. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. Blood. 2011;117(14):3921-8.
 34. Martelli MF, Di Ianni M, Ruggeri L, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, et al. HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse. Blood. 24 de julio de 2014;124(4):638-44.
 35. Pérez-Martínez A, González-Vicent M, Valentín J, Aleo E, Lassaletta A, Sevilla J, et al. Early evaluation of immune reconstitution following allogeneic CD3/CD19-depleted grafts from alternative donors in childhood acute leukemia. Bone Marrow Transplant. 2012;47(11):1419-27.
 36. Ji S-Q, Chen H-R, Wang H-X, Yan H-M, Zhu L, Liu J, et al. G-CSF-primed haploidentical marrow transplantation without ex vivo T cell depletion: an excellent alternative for high-risk leukemia. Bone Marrow Transplant. 12 de diciembre de 2002;30(12):861-6.
 37. Lu D-P, Dong L, Wu T, Huang X-J, Zhang M-J, Han W, et al. Conditioning including antithymocyte globulin followed by unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical blood

- and marrow transplantation can achieve comparable outcomes with HLA-identical sibling transplantation. *Blood*. 2006;107(8):3065-73.
38. Di Bartolomeo P, Santarone S, De Angelis G, Picardi A, Cudillo L, Cerretti R, et al. Haploidentical, unmanipulated, G-CSF-primed bone marrow transplantation for patients with high-risk hematologic malignancies. *Blood*. 31 de enero de 2013;121(5):849-57.
 39. Arcese W, Picardi A, Santarone S, De Angelis G, Cerretti R, Cudillo L, et al. Haploidentical, G-CSF-primed, unmanipulated bone marrow transplantation for patients with high-risk hematological malignancies: an update. *Bone Marrow Transplant*. junio de 2015;50 Suppl 2:S24-30.
 40. Berenbaum MC, Brown IN. PROLONGATION OF HOMOGRAFT SURVIVAL IN MICE WITH SINGLE DOSES OF CYCLOPHOSPHAMIDE. *Nature*. 5 de octubre de 1963;200:84.
 41. Luznik L, Jalla S, Engstrom LW, Iannone R, Fuchs EJ. Durable engraftment of major histocompatibility complex-incompatible cells after nonmyeloablative conditioning with fludarabine, low-dose total body irradiation, and posttransplantation cyclophosphamide. *Blood*. 2001;98(12):3456-64.
 42. Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, Chen AR, Leffell MS, Zahurak M, et al. HLA-Haploidentical Bone Marrow Transplantation for Hematologic Malignancies Using Nonmyeloablative Conditioning and High-Dose, Posttransplantation Cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant*. junio de 2008;14(6):641-50.
 43. Burroughs LM, O'Donnell PV, Sandmaier BM, Storer BE, Symons HJ, Jones RJ, et al. Comparison of Outcomes of HLA-Matched Related, Unrelated, or HLA-Haploidentical Related Hematopoietic Cell Transplantation following Nonmyeloablative Conditioning for Relapsed or Refractory Hodgkin Lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant*. noviembre de 2008;14(11):1279-87.
 44. Munchel A, Kesserwan C, Symons HJ, Luznik L, Kasamon YL, Jones RJ, et al. Nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation with high dose, post-transplantation cyclophosphamide. *Pediatr Rep [Internet]*. junio de 2011;3(2s). Recuperado a partir de: <http://www.pagepress.org/journals/index.php/pr/article/view/2833>
 45. Ciurea SO, Mulanovich V, Saliba RM, Bayraktar UD, Jiang Y, Bassett R, et al. Improved Early Outcomes Using a T Cell Replete Graft Compared with T Cell Depleted Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. diciembre de 2012;18(12):1835-44.
 46. Bashey A, Zhang X, Sizemore CA, Manion K, Brown S, Holland HK, et al. T-Cell-Replete HLA-Haploidentical Hematopoietic Transplantation for Hematologic Malignancies Using Post-Transplantation Cyclophosphamide Results in Outcomes Equivalent to Those of Contemporaneous HLA-Matched Related and Unrelated Donor Transplantation. *J Clin Oncol*. 1 de abril de 2013;31(10):1310-6.
 47. Di Stasi A, Milton DR, Poon LM, Hamdi A, Rondon G, Chen J, et al. Similar Transplantation Outcomes for Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome Patients with Haploidentical versus 10/10 Human Leukocyte Antigen-Matched Unrelated and Related Donors. *Biol Blood Marrow Transplant*. diciembre de 2014;20(12):1975-81.

48. Ronald Hoffman, Bruce Furie, Benz E, Glave PM, Leslie E Silberstein, Sanford J Shattil SJ. Hematology. Basic Principles and Practice. 2009.^a ed. Churchill;
49. Malavasi F, Funaro A, Alessio M, DeMonte LB, Ausiello CM, Dianzani U, et al. CD38: a multi-lineage cell activation molecule with a split personality. *Int J Clin Lab Res*. 1992;22(2):73-80.
50. Cotner T, Williams JM, Christenson L, Shapiro HM, Strom TB, Strominger J. Simultaneous flow cytometric analysis of human T cell activation antigen expression and DNA content. *J Exp Med*. 1 de febrero de 1983;157(2):461-72.
51. Damle NK, Engleman EG. Antigen-specific suppressor T lymphocytes in man. *Clin Immunol Immunopathol*. noviembre de 1989;53(2 Pt 2):S17-24.
52. Koide J, Engleman EG. Differences in surface phenotype and mechanism of action between alloantigen-specific CD8+ cytotoxic and suppressor T cell clones. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 de enero de 1990;144(1):32-40.
53. Liu W. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*. 3 de julio de 2006;203(7):1701-11.
54. Storek J. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood*. 1 de junio de 2001;97(11):3380-9.
55. Godfrey WR, Spoden DJ, Ge YG, Baker SR, Liu B, Levine BL, et al. Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood*. 15 de enero de 2005;105(2):750-8.
56. Komanduri KV, St. John LS, de Lima M, McMannis J, Rosinski S, McNiece I, et al. Delayed immune reconstitution after cord blood transplantation is characterized by impaired thymopoiesis and late memory T-cell skewing. *Blood*. 15 de diciembre de 2007;110(13):4543-51.
57. Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood*. 13 de mayo de 2010;115(19):3861-8.
58. Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, Wagner JE, Zhang M-J, Champlin RE, et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med*. 2004;351(22):2265-75.
59. Fallen PR, McGreavey L, Madrigal JA, Potter M, Ethell M, Prentice HG, et al. Factors affecting reconstitution of the T cell compartment in allogeneic haematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. noviembre de 2003;32(10):1001-14.
60. Hakim FT, Gress RE. Reconstitution of thymic function after stem cell transplantation in humans. *Curr Opin Hematol*. noviembre de 2002;9(6):490-6.
61. Ugarte-Torres A, Hoegh-Petersen M, Liu Y, Zhou F, Williamson TS, Quinlan D, et al. Donor Serostatus Has an Impact on Cytomegalovirus-Specific Immunity, Cytomegaloviral Disease Incidence, and Survival in Seropositive Hematopoietic Cell Transplant Recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*. abril de 2011;17(4):574-85.

62. Noel DR, Witherspoon RP, Storb R, Atkinson K, Doney K, Mickelson EM, et al. Does graft-versus-host disease influence the tempo of immunologic recovery after allogeneic human marrow transplantation? An observation on 56 long-term survivors. *Blood*. junio de 1978;51(6):1087-105.
63. Bosch M, Dhadda M, Hoegh-Petersen M, Liu Y, Hagel LM, Podgorny P, et al. Immune reconstitution after anti-thymocyte globulin-conditioned hematopoietic cell transplantation. *Cytotherapy*. septiembre de 2012;14(10):1258-75.
64. Jimenez M, Ercilla G, Martinez C. Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning regimens. *Leukemia*. 2007;21(8):1628-37.
65. Williams KM, Gress RE. Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol*. septiembre de 2008;21(3):579-96.
66. Mackall CL, Bare CV, Granger LA, Sharrow SO, Titus JA, Gress RE. Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 de junio de 1996;156(12):4609-16.
67. Mackall CL, Granger L, Sheard MA, Cepeda R, Gress RE. T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny. *Blood*. 1993;82(8):2585-94.
68. Shen S. Control of homeostatic proliferation by regulatory T cells. *J Clin Invest*. 1 de diciembre de 2005;115(12):3517-26.
69. Min B, Paul WE. Endogenous proliferation: Burst-like CD4 T cell proliferation in lymphopenic settings. *Semin Immunol*. junio de 2005;17(3):201-7.
70. Storek J, Ferrara S, Ku N, Giorgi JV, Champlin RE, Saxon A. B cell reconstitution after human bone marrow transplantation: recapitulation of ontogeny? *Bone Marrow Transplant*. octubre de 1993;12(4):387-98.
71. Griffith LM, McCoy JP, Bolan CD, Stroncek DF, Pickett AC, Linton GF, et al. Persistence of recipient plasma cells and anti-donor isohaemagglutinins in patients with delayed donor erythropoiesis after major ABO incompatible non-myeloablative haematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol*. marzo de 2005;128(5):668-75.
72. Suzuki I, Milner EC, Glas AM, Hufnagle WO, Rao SP, Pfister L, et al. Immunoglobulin heavy chain variable region gene usage in bone marrow transplant recipients: lack of somatic mutation indicates a maturational arrest [see comments]. *Blood*. 1996;87(5):1873-80.
73. Kumar D, Chen MH, Welsh B, Siegal D, Cobos I, Messner HA, et al. A Randomized, Double-Blind Trial of Pneumococcal Vaccination in Adult Allogeneic Stem Cell Transplant Donors and Recipients. *Clin Infect Dis*. 15 de diciembre de 2007;45(12):1576-82.
74. Olkinuora H, Talvensaari K, Kaartinen T, Siitonen S, Saarinen-Pihkala U, Partanen J, et al. T cell regeneration in pediatric allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2007;39(3):149-56.

75. Kim DH, Sohn SK, Won DI, Lee NY, Suh JS, Lee KB. Rapid helper T-cell recovery above 200 x 10⁶/l at 3 months correlates to successful transplant outcomes after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* junio de 2006;37(12):1119-28.
76. Berger M, Figari O, Bruno B, Raiola A, Dominietto A, Fiorone M, et al. Lymphocyte subsets recovery following allogeneic bone marrow transplantation (BMT): CD4+ cell count and transplant-related mortality. *Bone Marrow Transplant.* enero de 2008;41(1):55-62.
77. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, et al. Guidelines for Preventing Infectious Complications among Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: A Global Perspective. *Biol Blood Marrow Transplant.* octubre de 2009;15(10):1143-238.
78. Ljungman P. The role of cytomegalovirus serostatus on outcome of hematopoietic stem cell transplantation: *Curr Opin Hematol.* noviembre de 2014;21(6):466-9.
79. Maertens J, Marchetti O, Herbrecht R, Cornely OA, Flückiger U, Frere P, et al. European guidelines for antifungal management in leukemia and hematopoietic stem cell transplant recipients: summary of the ECIL 3—2009 update. *Bone Marrow Transplant.* 2010;46(5):709-18.
80. Chang Y-J, Zhao X-Y, Huo M-R, Xu L-P, Liu D-H, Liu K-Y, et al. Immune reconstitution following unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical transplantation compared with HLA-identical sibling transplantation. *J Clin Immunol.* abril de 2012;32(2):268-80.
81. Chang Y-J, Zhao X-Y, Huo M-R, Xu L-P, Liu D-H, Liu K-Y, et al. Influence of Lymphocyte Recovery on Outcome of Haploidentical Transplantation for Hematologic Malignancies: *Medicine (Baltimore).* noviembre de 2009;88(6):322-30.
82. Chang Y-J, Zhao X-Y, Huo M-R, Xu L-P, Liu D-H, Liu K-Y, et al. Clinical impact of absolute lymphocyte count on day 30 after unmanipulated haploidentical blood and marrow transplantation for pediatric patients with hematological malignancies. *Am J Hematol.* febrero de 2011;86(2):227-30.
83. Chang Y-J, Zhao X-Y, Huang X-J. Effects of the NK Cell Recovery on Outcomes of Unmanipulated Haploidentical Blood and Marrow Transplantation for Patients with Hematologic Malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant.* marzo de 2008;14(3):323-34.
84. Symons HJ, Kesserwan C, Kos F, Thoburn C, Munchel A, Ying W, et al. Favorable Immune Reconstitution After Nonmyeloablative, T-Cell Replete, HLA-Haploidentical BMT with Post-Transplant Cyclophosphamide. *Blood ASH Annu Meet Abstr.* 2011;118:Abstract 1009.
85. Kesserwan C, Munchel A, Kos F, Thoburn C, Hess A, Luznik L, et al. Immune reconstitution after nonmyeloablative, T-cell replete, HLA-haploidentical BMT with post-transplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17(2):S230-1.
86. Dominietto A, Raiola A, Bruno B, van Lint M, Frassoni F, Di Grazia C, et al. Rapid Immune Reconstitution Following Unmanipulated Haploidentical BMT with Post-Transplant High Dose Cyclophosphamide. *Blood ASH Annu Meet Abstr.* 2011;118:Abstract 3050.
87. Di Stasi A, Poon M, Hamdi A, Shaim H, Xie S, Denai M, et al. Reconstitution of Lymphocyte Subsets and Outcomes After Matched and Mismatched Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *Blood ASH Annu Meet Abstr.* 2012;120:Abstract 4485.

88. Gonzalez-Gascón y Marín I., Perez-Corral A., Gayoso J., Anguita J., Franco AC, Pascual C., et al. Early and Favourable Immune Reconstitution After Unmanipulated Haploidentical Stem Cell Transplantation With High Dose Post-Transplant Cyclophosphamide Regardless Intensity Of Conditioning Regimen. *Blood ASH Annu Meet Abstr.* 2013;122.
89. Palmer JM, Rajasekaran K, Thakar MS, Malarkannan S. Clinical Relevance of Natural Killer Cells Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Cancer.* 2013;4(1):25-35.
90. Gallez-Hawkins GM, Franck AE, Li X, Thao L, Oki A, Gendzekhadze K, et al. Expression of Activating KIR2DS2 and KIR2DS4 Genes after Hematopoietic Cell Transplantation: Relevance to Cytomegalovirus Infection. *Biol Blood Marrow Transplant.* noviembre de 2011;17(11):1662-72.
91. Gill S, Olson JA, Negrin RS. Natural Killer Cells in Allogeneic Transplantation: Effect on Engraftment, Graft- versus-Tumor, and Graft-versus-Host Responses. *Biol Blood Marrow Transplant.* julio de 2009;15(7):765-76.
92. Gilfillan S, Ho EL, Cella M, Yokoyama WM, Colonna M. NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol.* diciembre de 2002;3(12):1150-5.
93. Foley B, Cooley S, Verneris MR, Pitt M, Curtsinger J, Luo X, et al. Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function. *Blood.* 15 de marzo de 2012;119(11):2665-74.
94. Anfossi N, André P, Guia S, Falk CS, Roetynck S, Stewart CA, et al. Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I. *Immunity.* agosto de 2006;25(2):331-42.
95. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, Urbani E, Carotti A, Aloisi T, et al. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood.* 1 de julio de 2007;110(1):433-40.
96. Willemze R, Rodrigues CA, Labopin M, Sanz G, Michel G, Socié G, et al. KIR-ligand incompatibility in the graft-versus-host direction improves outcomes after umbilical cord blood transplantation for acute leukemia. *Leukemia.* marzo de 2009;23(3):492-500.
97. Giebel S. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood.* 3 de abril de 2003;102(3):814-9.
98. Farag SS, Bacigalupo A, Eapen M, Hurley C, Dupont B, Caligiuri MA, et al. The Effect of KIR Ligand Incompatibility on the Outcome of Unrelated Donor Transplantation: A Report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research, the European Blood and Marrow Transplant Registry, and the Dutch Registry. *Biol Blood Marrow Transplant.* agosto de 2006;12(8):876-84.
99. Cooley S, Trachtenberg E, Bergemann TL, Saeteurn K, Klein J, Le CT, et al. Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood.* 15 de enero de 2009;113(3):726-32.

100. Arase H, Mocarski ES, Campbell AE, Hill AB, Lanier LL. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science*. 17 de mayo de 2002;296(5571):1323-6.
101. Zaia JA, Sun JY, Gallez-Hawkins GM, Thao L, Oki A, Lacey SF, et al. The Effect of Single and Combined Activating Killer Immunoglobulin-like Receptor Genotypes on Cytomegalovirus Infection and Immunity after Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. marzo de 2009;15(3):315-25.
102. Tomblyn M, Young J-AH, Haagenson MD, Klein JP, Trachtenberg EA, Storek J, et al. Decreased Infections in Recipients of Unrelated Donor Hematopoietic Cell Transplantation from Donors with an Activating KIR Genotype. *Biol Blood Marrow Transplant*. agosto de 2010;16(8):1155-61.
103. Gumá M, Budt M, Sáez A, Brckalo T, Hengel H, Angulo A, et al. Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood*. 2006;107(9):3624-31.
104. Mandelboim O, Porgador A. NKp46. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001;33(12):1147-50.
105. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity*. 2004;21(2):241-54.
106. Rivas MN, Hazzan M, Weatherly K, Gaudray F, Salmon I, Braun MY. NK Cell Regulation of CD4 T Cell-Mediated Graft-versus-Host Disease. *J Immunol*. 15 de junio de 2010;184(12):6790-8.
107. Ardolino M, Zingoni A, Cerboni C, Cecere F, Soriani A, Iannitto ML, et al. DNAM-1 ligand expression on Ag-stimulated T lymphocytes is mediated by ROS-dependent activation of DNA-damage response: relevance for NK-T cell interaction. *Blood*. 5 de mayo de 2011;117(18):4778-86.
108. Rabinovich BA, Li J, Shannon J, Hurren R, Chalupny J, Cosman D, et al. Activated, but not resting, T cells can be recognized and killed by syngeneic NK cells. *J Immunol*. 2003;170(7):3572-6.
109. Zecher D, Li Q, Oberbarnscheidt MH, Demetris AJ, Shlomchik WD, Rothstein DM, et al. NK Cells Delay Allograft Rejection in Lymphopenic Hosts by Downregulating the Homeostatic Proliferation of CD8+ T Cells. *J Immunol*. 15 de junio de 2010;184(12):6649-57.
110. Moretta L, Ferlazzo G, Bottino C, Vitale M, Pende D, Mingari MC, et al. Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol Rev*. diciembre de 2006;214:219-28.
111. Nguyen S. NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood*. 15 de mayo de 2005;105(10):4135-42.
112. Mensen A, Na I-K, Häfer R, Meerbach A, Schlecht M, Pietschmann M-L, et al. Comparison of different rabbit ATG preparation effects on early lymphocyte subset recovery after allogeneic HSCT and its association with EBV-mediated PTL. *J Cancer Res Clin Oncol*. noviembre de 2014;140(11):1971-80.

113. Ganguly S, Ross DB, Panoskaltsis-Mortari A, Kanakry CG, Blazar BR, Levy RB, et al. Donor CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells are necessary for posttransplantation cyclophosphamide-mediated protection against GVHD in mice. *Blood*. 25 de septiembre de 2014;124(13):2131-41.
114. Buser A, Stern M, Arber C, Medinger M, Halter J, Rovo A, et al. Impaired B-cell reconstitution in lymphoma patients undergoing allogeneic HSCT: an effect of pretreatment with rituximab&quest. *Bone Marrow Transplant*. 2008;42(7):483-7.
115. Locatelli F, Pende D, Mingari MC, Bertaina A, Falco M, Moretta A, et al. Cellular and molecular basis of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in the successful treatment of high-risk leukemias: role of alloreactive NK cells. *Front Immunol*. 2013;4. Recuperado a partir de: <http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fimmu.2013.00015/full>
116. Chang Y-J, Zhao X-Y, Huang X-J. Immune Reconstitution after Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. abril de 2014;20(4):440-9.
117. Stern M, Passweg JR, Meyer-Monard S, Esser R, Tonn T, Soerensen J, et al. Pre-emptive immunotherapy with purified natural killer cells after haploidentical SCT: a prospective phase II study in two centers. *Bone Marrow Transplant*. marzo de 2013;48(3):433-8.
118. Theil A, Tuve S, Oelschlägel U, Maiwald A, Döhler D, Oßmann D, et al. Adoptive transfer of allogeneic regulatory T cells into patients with chronic graft-versus-host disease. *Cytotherapy*. abril de 2015;17(4):473-86.

Anexos

10. Anexos

Anexo I. Lista de tablas

Tabla 1. Resultados clínicos comparativos trasplante haploidentico frente a familiar idéntico protocolo GIAC.

Tabla 2. Inmunidad innata y adaptativa. Características y células implicadas.

Tabla 3. Características de la reconstitución inmune temprana no timo-dependiente.

Tabla 4. Receptores de células NK y principales funciones.

Tabla 5. Paneles de combinaciones de anticuerpos monoclonales utilizados para el estudio en los diferentes puntos.

Tabla 6. Principales características clínicas de los pacientes del grupo de trasplante haploidentico y del grupo control de trasplante alogénico familiar idéntico. Todos los resultados expresados en mediana y percentiles 25-75.

Tabla 7. Recuentos linfoides T en grupo haploidentico y grupo control. Expresados en células por microlitro, mediana y percentiles 25 y 75.

Tabla 8. Comparación de las poblaciones linfoides T naïve y de memoria entre ambos grupos expresados en células/microlitro.

Tabla 9. Comparación de la reconstitución de los linfocitos de origen tímico entre ambos grupos expresados en células/microlitro.

Tabla 10. Comparación entre las poblaciones de linfocitos T citotóxicos CD3+CD8+CD57+ en grupo haploidentico y grupo control, expresados en células/microlitro.

Tabla 11. Porcentaje de linfocitos T citotóxicos CD3+CD8+CD57+ con expresión de CD28 positivo.

Tabla 12. Recuentos de los linfocitos T CD4+ y CD8+ con expresión de marcadores de activación en ambos grupos, expresados en células/microlitro.

Tabla 13. Comparación de los recuentos de Linfocitos T reguladores entre ambos grupos, expresados en células/microlitro.

Tabla 14. Recuentos linfocitos B en ambos grupos, expresados en células/microlitro.

Tabla 15. Recuentos absolutos de Linfocitos B Naïve y de memoria en ambos grupos, expresados en células/microlitro.

Tabla 16. Niveles de inmunoglobulinas en los puntos de estudio entre ambos grupos, expresados en mg/dl.

Tabla 17. Recuentos totales de células NK expresadas en células/microlitro.

Tabla 18. Porcentaje de células NK inmaduras y maduras, con expresión alta y baja de CD56 (CD56bright y CD56dim) .

Tabla 19. Expresión de marcadores no KIR en las células NK en ambos grupos.

Tabla 20. Medianas y comparación de subpoblaciones en el grupo haploidéntico entre los pacientes sin y con EICR aguda.

Tabla 21. Medianas y comparación de subpoblaciones NK y expresión de receptores no KIR en el grupo haploidéntico entre los pacientes con y sin EICR aguda.

Anexo II. Lista de figuras.

Figura 1. Probabilidad de supervivencia global en años postrasplante en enfermedad temprana según diferencias HLA. Original de Pidala y cols.

Figura 2. Algoritmo de elección de donante del grupo europeo de trasplante.

Figura 3. Protocolo original Johns Hopkins comparado con protocolo adaptado HGUGM.

Figura 4. Representación gráfica del equilibrio de fuerzas inmunes en el trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos y factores influyentes.

Figura 5. Gráfico de la reconstitución inmune. Adaptado de Williams y cols.

Figura 6. Gráfico de reconstitución inmune de las subpoblaciones linfocitarias post trasplante alogénico. Adaptada de Williams y cols. Eje vertical porcentaje de recuperación, eje horizontal meses postrasplante.

Figura 7. Principales fases de inmunosupresión postrasplante y riesgo infeccioso. Adaptada de Tomblyn y cols.

Figura 8. Original de Ciurea y cols. Recuperación de las subpoblaciones linfoides T tras un trasplante haploidéntico o manipulado(TCR) o con depleción T (TCD). A. Reconstitución de linfocitos T CD8+. B. Reconstitución de linfocitos T CD4+. E. Reconstitución de células NK. F. Reconstitución de linfocitos B.

Figura 9. Reconstitución inmune de linfocitos T en trasplante haploidéntico frente a donante HLA idéntico emparentado y no emparentado. Original de Di Stasi et al.

Figura 10. Protocolo de acondicionamiento mieloablativo del trasplante haploide no manipulado.

Figura 11. Protocolo de acondicionamiento no mieloablativo del trasplante haploide no manipulado.

Figura 12. Protocolo de acondicionamiento Bux-Flu mieloablativo.

Figura 13. Acondicionamiento Bux –Flu no mieloablativo.

Figura 14. Protocolo de acondicionamiento Flu-Mel no mieloablativo.

Figura 15. Reconstitución de linfocitos T CD4+ totales(15a) y T CD8+ totales(15b) en ambos grupos.

Figura 16. Comparación entre células T Naïve y de Memoria por microlitro en ambos grupos (+30,+90,+180,+360). Fig. 16a. Linfocitos T CD4+ Naïve y Memoria en ambos grupos. Fig. 16b. Linfocitos T CD8+ Naïve y Memoria en ambos grupos .

Figura 17. Reconstitución de las poblaciones T Naïve y de memoria en ambos grupos.

Figura 18. Reconstitución de los linfocitos de origen tímico en ambos grupos.

Figura 19. Reconstitución de linfocitos T citotóxicos CD3+CD8+CD57+ en ambos grupos.

Figura 20. Reconstitución de linfocitos T con expresión de marcadores de activación.

Figura 21. Reconstitución de Linfocitos T reguladores.

Figura 22. Reconstitución linfocitos B en ambos grupos.

Figura 23. Distribución de los linfocitos B en linfocitos B Naïve y de memoria en ambos grupos. Resultados expresados en células/microlitro.

Figura 24. Reconstitución IgG , IgM , IgA en ambos grupos.

Figura 25. Reconstitución NK en ambos grupos.

Figura 26. Porcentaje de Células NK CD56 Bright /Expresión de NKG2A en ambos grupos.

Figura 27. Porcentaje de expresión de NKp46 y NKp30 en ambos grupos.

Figura 28. Porcentaje de expresión de NKG2D en ambos grupos.

Figura 29. Linfocitos T totales según la presencia o no de EICR aguda.

Figura 30. Linfocitos T CD4+ Naïve por microlitro según la presencia o no de EICR aguda.

Figura 31. Linfocitos T CD4+ de origen tímico según la presencia o no de EICR aguda.

Figura 32. Linfocitos T CD4+ reguladores por microlitro según la presencia o no de EICR aguda.

Figura 33. Comparación de reconstitución NK entre pacientes con y sin EICRa. 33a.NK totales por microlitro. 33b. Expresión de NKP46. 33c. Porcentaje de NK inmaduras (CD56^{bright}). 33d. Porcentaje de NK maduras (CD56^{dim}).

Figura 34. Subpoblaciones CD8+ y linfocitos T citotóxicos en pacientes con y sin reactivación CMV.

Figura 35. Curvas de supervivencia global según el ALC 30.

Figura 36. Curvas de supervivencia global según Linfocitos T CD3+ en el día +30.

Figura 37. Curvas de supervivencia global según los Linfocitos T CD4+ a los 3 meses.

Figura 38. Curvas de supervivencia libre de enfermedad según el ALC 30.

Figura 39. Incidencia acumulada de mortalidad infecciosa e el grupo haploidéntico.

Figura 40. Incidencia acumulada de mortalidad infecciosa según el ALC30.

Figura 41. Incidencia acumulada de mortalidad infecciosa según los linfocitos T día +30.

Figura 42. Curvas de supervivencia global según el porcentaje de células NK con expresión intensa de CD56 (CD56Bright).

Figura 43. Curvas de supervivencia libre de enfermedad según el porcentaje de células NK con expresión intensa de CD56 (CD56^{bright}).